



UNIVERSIDAD  
**PABLO DE  
OLAVIDE**  
SEVILLA



**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Tesis doctoral

Estudio del 3,4-dihidroxifenilglicol  
(DHFG): fuentes, obtención y propiedades  
antiinflamatoria y fitorreguladora

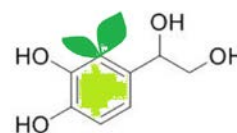
María África Fernández Prior

Directores:

Guillermo Rodríguez Gutiérrez

Juan Antonio Espejo Calvo

2021



# Índice

Resumen general.....1

Introducción.....5

Objetivos.....46

Marco teórico.....50

Publicaciones:

## Capítulo I

New Liquid Source of Antioxidant Phenolic Compounds in the Olive

Oil Industry: Alperujo Water.....62

## Capítulo II

Deep eutectic solvents improve the biorefinery of alperujo by extraction

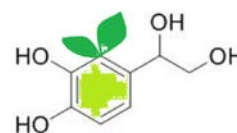
of bioactive molecules in combination with industrial thermal

treatments.....79

## Capítulo III

Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol and

3,4-Dihydroxyphenylglycol Purified from Table Olive Effluents..... 94



## Capítulo IV

Use of 3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG) as a plant growth regulator.....111

## Capítulo V

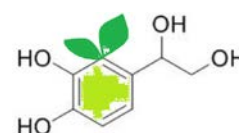
Procedimiento de obtención de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG).....151

Discusión general.....170

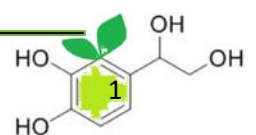
Conclusiones generales.....182

Otras aportaciones directamente relacionadas con la tesis.....185

Curriculum vitae.....189



# Resumen general



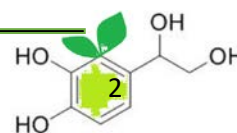


## Resumen general

La cuenca de los países del Mediterráneo en su conjunto forma parte de los mayores productores y exportadores de aceite de oliva a nivel mundial, y se han enfrentado durante décadas al exigente reto que supone la gestión de los subproductos que se generan en la industria olivícola. A lo largo de la historia, este sector se ha ido modernizando, buscando siempre calidad y bajos costes en su producción e indagando en la mejora de la incidencia que estos subproductos generan en la salud humana, animal y medio ambiental.

Originalmente, la producción de aceite de oliva se llevaba a cabo a través de un sistema discontinuo que fue desplazado por los más recientes sistemas continuos, ya sean de dos o tres fases. En España, el decanter de dos fases, donde se genera aceite de oliva y alperujo se ha establecido como prioritario frente al de tres fases en el que además del aceite se generan orujo y alpechín. Además, los grandes volúmenes de salmueras que se producen en la industria de la aceituna de mesa es otro gran desafío a la hora su gestión. Por otro lado, existe un subproducto que hasta ahora era destinado principalmente a la quema y genera millones de toneladas como son las hojas y restos de poda del olivo.

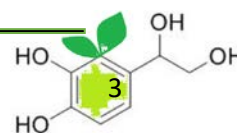
La importancia de la gestión de los subproductos no es solo por motivos medio ambientales, sino que también hay que tener en cuenta que la principal riqueza de éstos radica en que poseen la mayor parte de los componentes más bioactivos de la aceituna. Hay que resaltar, entre otros muchos, los compuestos fenólicos como el hidroxitirosol, el tirosol y la oleuropeína, que son objeto de estudio por sus innumerables propiedades como la de ser extraordinarios antioxidantes, antifúngicos, anticancerosos, antiagregantes plaquetarios, antiinflamatorios y un largo etc. Sin embargo, uno de los más recientemente descubiertos en los subproductos y por ello menos estudiado es el 3,4- dihidroxifenilglicol



(DHFG), que sólo o en sinergia con el HT se está convirtiendo en el fenol simple con mayor potencial en farmacología, cosmética, alimentación y en el mundo agrario como un magnífico fitorregulador del crecimiento de cultivos.

Uno de los objetivos del presente trabajo fue la búsqueda de fuentes de DHFG accesibles, económicas y sostenibles a partir de los subproductos de la industria de la aceituna. En esta búsqueda se han estudiado efluentes líquidos generados en el almacenamiento del alperujo que, al ser enriquecidos con aguas procedentes de la almazara, han aumentado su contenido en DHFG. Así mismo, con la finalidad de posibilitar la obtención de una fuente líquida rica en DHFG a partir de los tratamientos térmicos, que actualmente se están realizando para el aprovechamiento del alperujo, se ha hecho uso de los disolventes eutécticos profundos (DES). La combinación de estos disolventes con tratamientos térmicos no solo es muy efectiva para la obtención de DHFG, sino que además disminuye drásticamente la temperatura en el proceso, permitiendo una considerable reducción en el consumo energético. Así mismo, otro recurso para la obtención de fenoles estudiado son las aguas de conservación de las aceitunas de mesa en tres líquidos de conservación (salmuera, salmuera con ácido acético y agua acidificada). Los nuevos efluentes líquidos basados en el uso del ácido acético en la industria de las aceitunas de mesa facilitan la solubilización y extracción de HT y de DHFG. A partir de la purificación de estos fenoles se ha determinado la actividad antiinflamatoria *in vitro* mediante la evaluación de citoquinas proinflamatorias, para poder hacer uso de ellos en la industria farmacéutica como potenciales candidatos para combatir enfermedades de origen inflamatorio.

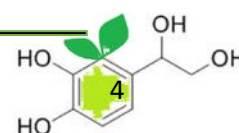
Por otro lado, y desde un punto de vista agronómico el DHFG suma al conjunto de sus actividades biológicas la de ser un excelente fitorregulador que es capaz de potenciar la germinación y crecimiento de cultivos como el trigo, y la de frenar o mantener bajo control la de las malas hierbas a muy bajas concentraciones. El uso en agricultura de un



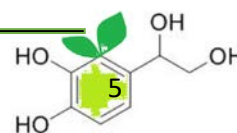
compuesto con estas características supondría la eliminación de los riesgos que suponen el uso de los herbicidas sintéticos para los ecosistemas adyacentes a campos destinados a cultivos, así como al hombre.

Posteriormente, y con el objeto de poder llevar a nivel industrial la obtención del DHFG para su uso tanto en agricultura como en alimentación o en farmacia, se diseñó un nuevo procedimiento a partir de las distintas fuentes que dio lugar a un novedoso sistema. Éste permite la extracción y purificación de un extracto rico en DHFG con baja concentración de HT. Este extracto se obtiene sólo por procedimientos físicos y económicos y permite la extracción del DHFG con un porcentaje de HT inferior al 10%, lo cual posibilita su uso agrícola.

Como resultado de todas las investigaciones llevadas a cabo en este trabajo de tesis se ha conseguido detectar nuevas fuentes del DHFG a partir de los subproductos de las industrias del aceite de oliva y de la aceituna de mesa, así como un sistema sencillo de extracción y purificación de este fenol. Lo que puede permitir aportar beneficios importantes en desarrollar procesos que sean respetuosos con el entorno y económicamente viables. Todo esto ha permitido obtener extractos purificados para la verificación de propiedades poco estudiadas del DHFG como son la antiinflamatoria y fitorreguladora, así como hallar en este compuesto un producto comercial natural no tóxico, no contaminante, que no genera residuos y que es inocuo para la salud humana, animal y para el medio ambiente.



# Introducción

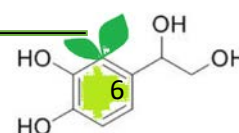


## Introducción

### 1.1. Industria olivícola

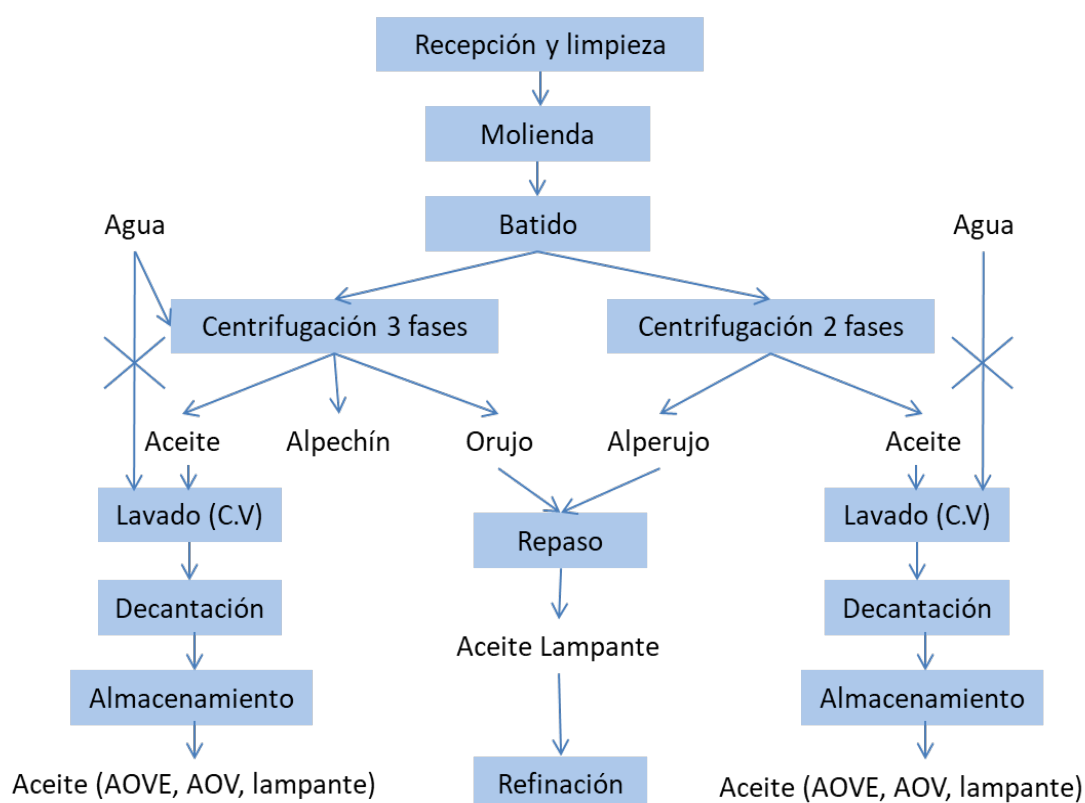
La aceituna, fruto del olivo (*Olea europea*) es la materia prima de la industria olivícola. Está compuesta principalmente por dos subsectores industriales que aportan desarrollo económico, social y cultural en ciertas regiones del territorio español, remarcando Andalucía como comunidad pionera en el sector. Estas industrias son la de la extracción del aceite de oliva (almazara y extractoras de orujo u orujeras) y la producción de la aceituna de mesa (entamadoras y envasadoras), industrias en continuo auge debido a la gran demanda de sus dos productos tanto a nivel nacional como internacional. La superficie sembrada de olivar alcanza los 11 millones de hectáreas en todo el mundo de las cuales 2.5 millones corresponden a territorio español. Con estos datos España se sitúa a la cabeza mundial en producción, comercialización y exportación de aceite de oliva cuya producción alcanza el 60 % a nivel europeo y el 40 % en producción mundial de aceite, mientras que en aceituna de mesa supera el 70% en Europa y el 22 % en todo el mundo ([www.internationaloliveoil.org](http://www.internationaloliveoil.org)).

Como toda industria, el sector olivarero no solo genera beneficios económicos y desarrollo social en su entorno, sino que hay que hablar paralelamente de los subproductos que de él se obtienen. El olivar ha ido progresivamente ampliando su función tradicional alimentaria para convertirse al mismo tiempo en proveedor de otros recursos como el energético y el más emergente que es el de la obtención de compuestos bioactivos que se aplican en la industria de la alimentación animal, humana, compostaje, cosmética y farmacéutica.

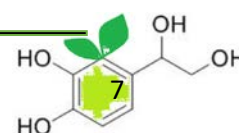


### 1.1.1. Industria del aceite de oliva.

Los datos de producción de aceite de oliva muestran la gran importancia del sector almazarero en España, y desde el punto de vista industrial, se deduce el gran volumen de subproductos que genera este sector, ya que sólo se aprovecha entre un 20-25% del peso de la aceituna para la obtención de aceite de oliva virgen, formando el resto parte de los subproductos generados por esta agroindustria. La producción en España de aceite de oliva ha ido evolucionando de forma progresiva en las últimas décadas con el objetivo fundamental de mejorar la calidad del producto final y minimizar el impacto medio



**Figura 1.** Esquema de los sistemas de extracción del aceite de oliva de dos y tres fases para la obtención de los distintos tipos de aceites de oliva.



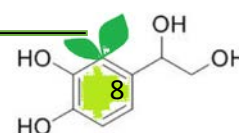
ambiental que este proceso genera, así como reducir los costes económicos.

En la década de los años setenta se ideó un sistema de extracción de tres fases donde se generan dos residuos, alpechín y orujo con alta carga contaminante. Para remediar el perjuicio al medio ambiente, en los años noventa se cambió a un sistema de extracción de dos fases, donde se genera un solo subproducto denominado alperujo (Figura 1).

En la actualidad, el sistema de extracción en tres fases supone menos de un 5% de la producción en España, aunque en otros países productores como en Italia se sigue usando aún en la mayor parte de las almazaras. Este sistema genera enormes volúmenes de alpechín que provienen principalmente de las aguas de vegetación de las aceitunas y el agua añadida durante la fase de batido. Este líquido contiene cerca del 90 % de agua, siendo el 10 % restante polisacáridos, proteínas, ácidos orgánicos y compuestos aromáticos. Mientras que el orujo contiene en torno al 45 % de humedad, restos de piel, pulpa, hueso y grasas (Nunes y col., 2016).

La finalidad del cambio de un sistema de tres fases al de dos fases era la de minimizar el impacto ambiental que se producía con la generación de estos grandes volúmenes de alpechín en las almazaras. Sin embargo, el problema no se ha solventado totalmente y ha sido trasvasado desde las almazaras hasta las orujeras. El principal cambio tecnológico del sistema de dos fases radica en la fase de centrifugación, donde ya no se hace necesaria la adición de agua para facilitar la extracción del aceite. En este sistema se producen en los decaners únicamente dos fases, una oleosa y otra semisólida o alperujo. El alperujo presenta una alta humedad (60-70%) ya que incluye el agua de vegetación.

En ambos sistemas se obtienen aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva virgen, aceite de oliva y aceite de orujo, habiendo pasado los dos últimos por un proceso de refinado físico o químico para la eliminación de los defectos. En el caso del aceite de orujo se obtiene a partir del alperujo y en las orujeras o extractoras, ya fuera de las almazaras.

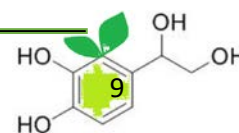


- Subproductos de la industria del aceite de oliva

Los efluentes y residuos que se generan en la industria del aceite de oliva dependen del sistema de extracción y engloba tanto los producidos en las almazaras como en las extractoras de orujo u orujeras. Destacan el alpechín y el orujo en el sistema de extracción de tres fases y el alperujo en el sistema de extracción en dos fases, pero no son los únicos efluentes que se generan. En España destaca el alperujo y otros efluentes líquidos como principales subproductos de la industria del aceite de oliva (Figura 2). El alperujo es una pasta semisólida de composición muy compleja constituida por una mezcla de piel, pulpa y hueso con una elevada humedad que alcanza el 70 % y un alto contenido en materia orgánica que llega a 90 %, así como celulosa, hemicelulosa y pectinas. También es rica en moléculas de alto valor como lípidos, glúcidos y fenoles (Nunes y col., 2016). A partir del alperujo se obtienen de forma habitual aceite de orujo y hueso para su uso fundamental como combustible, y también como agente abrasivo, producción de carbón activo, materiales termoplásticos, etc. (Rodríguez y col., 2008). En la actualidad aún se utilizan balsas para otros efluentes líquidos obtenidos tanto en almazaras como en orujeras, y también balsas de almacenamiento del alperujo, todo ello con el consecuente impacto en el entorno.



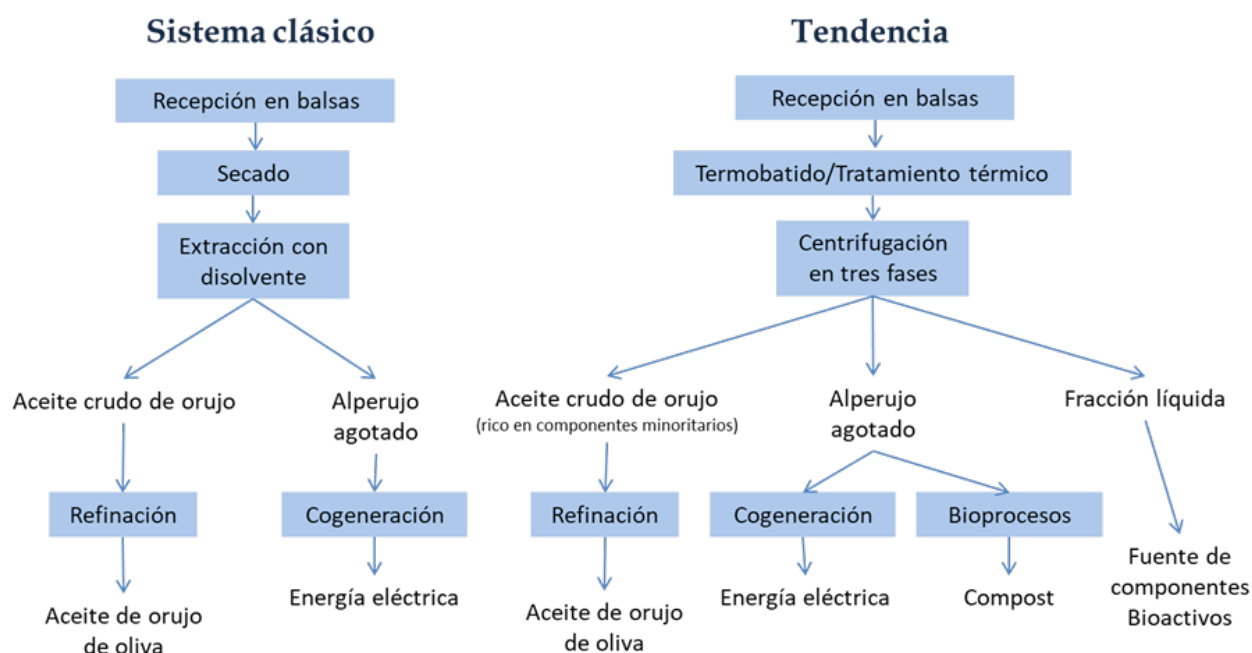
**Figura 2.** Detalle (izquierda) de una balsa de efluentes líquidos de la industria del aceite de oliva y del alperujo (derecha).





Los subproductos líquidos también se almacenan en enormes balsas donde se evapora la mayor parte de la humedad, sin embargo, se siguen produciendo infiltraciones que pueden pasar a las aguas subterráneas provocando contaminación de acuíferos y perjuicios graves en la flora y la fauna cercanas, así como la contaminación atmosférica.

Por otro lado, en el caso de la industria del aceite de orujo u orujeras es importante distinguir entre los dos tipos de procesos, el clásico y el termobatido (Lama-Muñoz y col., 2019) (Figura 3). En el sistema clásico el alperujo es sometido a un proceso de secado en reactores rotatorios de aire caliente para disminuir la humedad hasta a un 8%, seguidamente el sólido seco se trata con sistemas de extracción con disolvente orgánico, n-hexano, para extraer el aceite de orujo que se tiene finalmente evaporando dicho disolvente. Este sistema implica elevados costos de operación y la generación de varios puntos críticos de contaminación.

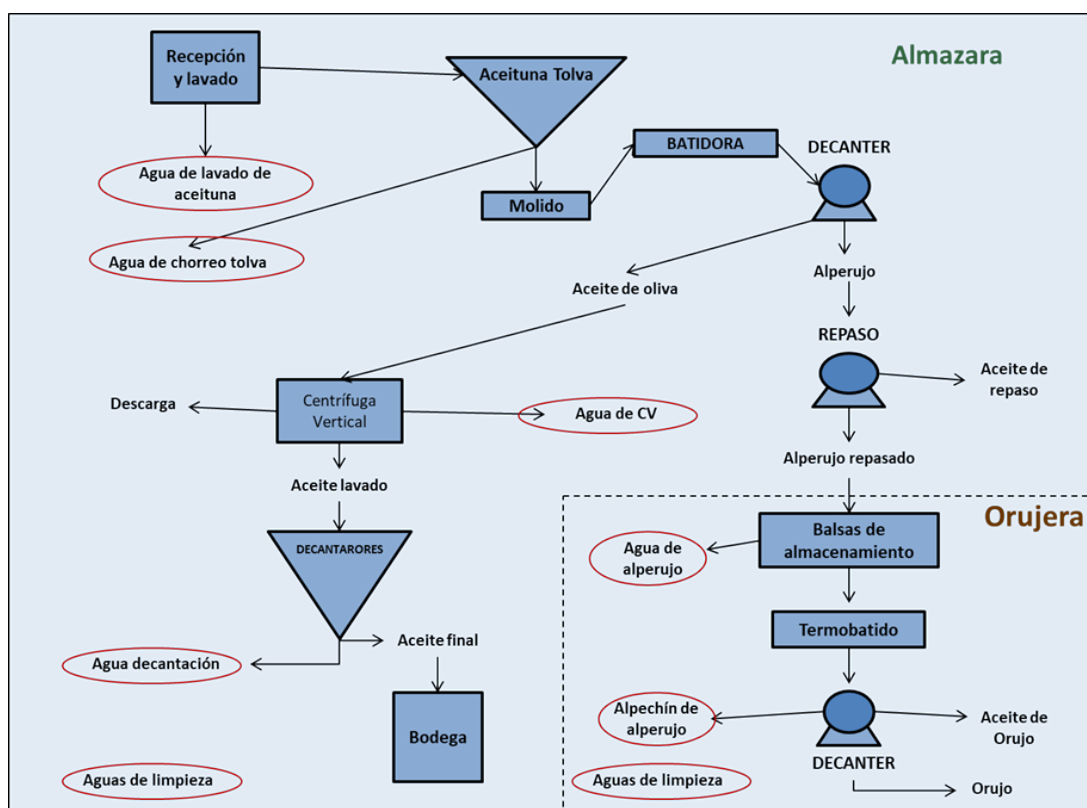


**Figura 3.** Esquema de procesos en las orujeras, sistema clásico y el sistema de termobatido.

El termobatido se presenta como una alternativa más sostenible y actual y se basa en eliminar el uso de disolventes orgánicos y usar un sistema de dos o tres fases tras realizar una fase de batido a temperaturas de entre 45 y 65 °C. Con ello se consigue, si se usa un sistema de dos fases, disminuir la humedad del alperujo reduciendo costes en el posterior secado, así como la generación de una nueva fuente líquida rica en compuestos de alto valor añadido. Si lo que se aplica en un sistema de tres fases se obtiene además un aceite de orujo enriquecido en componentes minoritarios que puede producir un aceite final funcional (Sánchez- Moral y Ruiz-Méndez, 2006).

El sistema de termobatido se basa en la aplicación de pretratamientos térmicos para facilitar la separación de las fases del alperujo y la solubilización de los principales componentes bioactivos a la fase líquida, desde donde es posible su obtención (Lama-Muñoz y col., 2019). Los últimos cambios que se están produciendo en esta industria están promovidos por la reciente incorporación al mercado de productos e ingredientes naturales con importantes propiedades para la salud (Fernández-Bolaños y col 2008). En ambos casos los sólidos residuales se emplean en la generación de energía a través de las centrales de cogeneración que fueron promovidas e incentivadas para aumentar la producción energética a partir de biomasa (Real Decreto 436/2004). Estas ayudas han hecho posible gestionar los grandes volúmenes de alperujo y de orujo (Lama-Muñoz y col., 2019) aunque no un aprovechamiento más integral o valioso de los mismos. Pero debido a las últimas crisis económicas estos incentivos han sufrido una importante merma que ha provocado en el sector una búsqueda alternativa para la gestión de dichos subproductos. Alternativas como el uso en alimentación animal, compostaje o aplicación de bioprocesos son las que están proliferando gracias a los nuevos productos que se obtienen y las ventajas medio ambientales que conlleva (Serrano y col., 2019).

En la Figura 4 se aprecia un esquema de producción para el sistema de dos fases en las almazaras y en una extracción en tres fases en la orujera. Se puede observar que además del alperujo, se generan otra serie de efluentes líquidos. En las almazaras se producen las aguas de lavado de las aceitunas, las aguas de chorreo de tolva en el almacenamiento de la aceituna antes de su molienda, las aguas de la descarga de la centrífuga vertical en el lavado del aceite tras el decanter, las aguas procedentes de la decantación del aceite antes de ser almacenado en bodega y las aguas de proceso. En el caso de las aguas de chorreo y de la centrífuga vertical se suelen usar para adicionar a lo que se denominan pastas difíciles que provienen de aceitunas con bajo contenido que dificultan la extracción del aceite, o bien se adicionan al alperujo final para su traslado a las orujeras, lo que incrementa considerablemente su humedad y con ello su tratamiento. Por otro lado, en las orujeras se produce además de las aguas de proceso las denominadas aguas de alperujo procedentes de las balsas de almacenamiento del alperujo y las aguas de la centrífuga o también llamadas alpechín de alperujo. La mayor parte de estas aguas tanto de almazara como de orujeras son almacenadas en grandes balsas para su evaporación y en el caso de las aguas con menor carga orgánica, como las de proceso o las que hayan sido depuradas ya parcialmente en las balsas, son dirigidas a plantas de depuración en las que se suele usar un tratamiento químico combinado con otro físico (Alonso-Fariñas y col., 2020). Otros usos para el aprovechamiento de estos efluentes líquidos son el riego fertilizante, concentración térmica, depuración mediante digestión anaerobia, ultrafiltración, ósmosis inversa, adsorción/biofiltración y oxidación húmeda, así como el uso de procesos combinados (Alonso-Fariñas y col., 2020).



**Figura 4.** Esquema de producción y formación de subproductos y efluentes en las almazaras para un sistema de producción de dos fases y en orujeras para un sistema de termobatido.

En el caso del alperujo es un material semisólido con escasa porosidad, abundante humedad, rico en materia orgánica y potasio y que contiene grasas, carbohidratos hidrosolubles y fenoles. El contenido en fósforo es bajo, así como el de micronutrientes y nitrógeno, por lo que la relación C/N es generalmente elevada, con un valor medio de 48, demasiado alejado del óptimo establecido para el compostaje. Es por ello por lo que siempre se promueve la adición de una fuente extra de nitrógeno, como por ejemplo subproductos derivados de la industria cárnica.

El principal valor comercial del alperujo es su uso como materia prima en la obtención del aceite de orujo en plantas extractoras u orujeras, las cuales utilizan en el proceso n-hexano como disolvente extractivo, obteniendo un residuo denominado “orujillo” u “orujo extractado”, cuyas principales utilidades actuales son las energéticas gracias a su

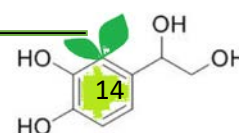
capacidad calorífica (3.500 kcal/h). También y como se ha mencionado anteriormente, se usa como combustible en la generación de energía eléctrica o para la obtención de calor (Lama-Muñoz y col., 2019).

Otras aplicaciones de los alperujos y orujillos, menos utilizadas en la actualidad son la formulación de piensos y su uso como fertilizante. La formulación de piensos se realiza a través de procesos de fermentación en estado sólido, aprovechando su alto contenido en fibra, azúcares y algunos minerales (Berbel y Posadillo., 2018). Y su uso como fertilizante orgánico, se realiza aplicado directamente o bien estabilizado a través de un proceso de compostaje o vermicompostaje para la producción de fertilizantes orgánicos (Plaza y col., 2008).

Otro subproducto que se genera en grandes cantidades es la hoja de olivo y los restos de poda o también conocido como hojín. Su principal uso es para alimentación animal, seguido de uso como biomasa para producción de energía y finalmente para incorporación directa al suelo o formación de compost. También pueden tener un gran mercado en cuanto a la obtención de ingredientes, de hecho, son ya algunas las empresas que extraen un concentrado de oleuropeína que hidrolizan para venderlo como extracto rico en hidroxitirosol.

#### 1.1.2. *Industria de la aceituna de mesa.*

La Unión Europea (UE), según el Consejo Oleícola Internacional, es la principal productora de aceituna de mesa del mundo y dentro de la UE España es la principal productora con aproximadamente 520.000 toneladas anuales, lo que supone que como país también sea el primer productor mundial seguida por Egipto. La mayor parte de la recolección se realiza de forma manual, para disminuir el molesto del fruto, aunque, y



cada vez más, se fomenta los cultivos intensivos y superintensivos de recolección mecanizada. En cuanto al procesado la mayor parte de las operaciones (desrabado, deshuesado, relleno) están mecanizadas, así como la operación de escogido mecánico que consiste en la separación de las aceitunas moradas a la entrada de la fábrica está resuelta en la mayoría de las industrias. En cuanto a fermentadores el 86,4% son enterrados (**Figura 5**), el 6,3% son aéreos y el 7,3% están en bodegas. El 39,6% de las industrias se dedican solo a conservación y cocido, el 24,5% solo a cocido, el 3,8% solo conservación, solo envasado el 1,9% y el 30,2% hacen el proceso completo (<https://www.internationaloliveoil.org/>).



**Figura 5.** Patio de fermentadores enterrados (izquierda) y balsa de evaporación natural de los efluentes líquidos de la industria de aderezo (derecha).

Según la Norma de Calidad (COI/OT/NC nº 1 Diciembre de 2004) las aceitunas de mesa se dividen en cuatro tipos: la verde, la de color cambiante, la negra y la ennegrecida, según el grado de madurez de las mismas:

- Verdes: son las aceitunas de frutos recogidos durante el ciclo de maduración, antes del envero y cuando han alcanzado un tamaño normal.
- De color cambiante: obtenidas de frutos con color rosado, rosa vinoso o castaño, recogidos antes de su completa madurez, sometidos o no a tratamientos alcalinos y listas para su consumo.

- Negras: obtenidas de frutos recogidos en plena madurez o poco antes de ella, pudiendo presentar, según zona de producción y época de la recogida, color negro rojizo, negro violáceo, violeta oscuro, negro verdoso o castaño oscuro.
  - Ennegrecidas por oxidación: son las obtenidas de frutos que no estando totalmente maduros han sido oscurecidos mediante oxidación y han perdido el amargor mediante tratamiento con lejía alcalina, debiendo ser envasadas en salmuera y preservadas mediante esterilización con calor. Son recolectadas a la vez que las aceitunas verdes.
- 
- Procesado de la aceituna de mesa

La otra línea del aprovechamiento agroindustrial del olivar está representada por el sector de elaboración de la aceituna de mesa. La entamadora es el lugar al que se derivan aquellas aceitunas destinadas al consumo como aceitunas de mesa donde se elaboran a partir de procesos de fermentación o salazón.

En España la mayor parte de la aceituna se elabora de forma tradicional, es decir aderezada o tratada con hidróxido sódico (NaOH) en verde, también conocida como aceituna Sevillana, aunque cada vez tiene más auge la producción de la aceituna verde para su posterior oxidación a aceituna negra. El 78% de las industrias hacen solo aceituna en verde, un 11% hacen verde y negra oxidada y el resto hacen verde y negra natural. La mayoría de las aceitunas de mesa que se procesan en España son cocidas con NaOH y tratadas con salmuera, obteniéndose un volumen de efluente residual de entre 6-12 L/kg de aceituna (Garrido y col., 1992). El resultado son ingentes cantidades de efluentes líquidos de muy difícil gestión por su contenido en materia orgánica y su elevada conductividad.

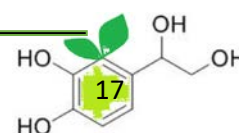
Hay varios tipos de procesado, todos ellos encaminados a eliminar el amargor provocado por la presencia de componentes fenólicos, fundamentalmente la oleuropeína.

Los principales procesos se citan a continuación (COI/OT/NC nº 1 Diciembre de 2004):

- Aderezo o cocido: se basan en el tratamiento con NaOH, o también llamado en la industria de aderezo como lejía alcalina o sosa, para ser posteriormente acondicionadas en salmuera en donde sufren una fermentación completa o parcial.
- Curado en salmuera: las aceitunas son tratadas directamente en una salmuera, donde sufren una fermentación completa o parcial.
- Oxidación: es el proceso en el que las aceitunas tanto verdes como color cambiante, que han sido previamente conservadas en salmuera y pueden haber sufrido o no un proceso de fermentación, se oxidan en medio alcalino.
- Deshidratación: en este proceso las aceitunas pierden parte de su contenido en agua al ser tratadas en sal seca o son secadas térmicamente o por cualquier otro procesado.
- Otros procesos de elaboración. Existen otros procesos diferentes o complementarios a los definidos anteriormente.

A continuación, se describe el proceso tipo Sevillano al ser el más usado:

- El primer paso es el “cocido” con lejía alcalina, en el cual se trata la aceituna con solución diluida de NaOH para eliminar el sabor amargo del fruto, debido a la presencia de la oleuropeína, y permite además aumentar la permeabilidad del fruto. La concentración de NaOH utilizada depende de la variedad de la aceituna, de la temperatura y el grado de madurez. El consumo de agua en el proceso es de aproximadamente 0,5 L/kg de aceituna.
- Posteriormente se procede a los lavados para eliminar la mayor cantidad de NaOH en la aceituna. También se consigue la eliminación del sabor amargo y valores de pH que favorecen la posterior fermentación láctica. El número de lavados es



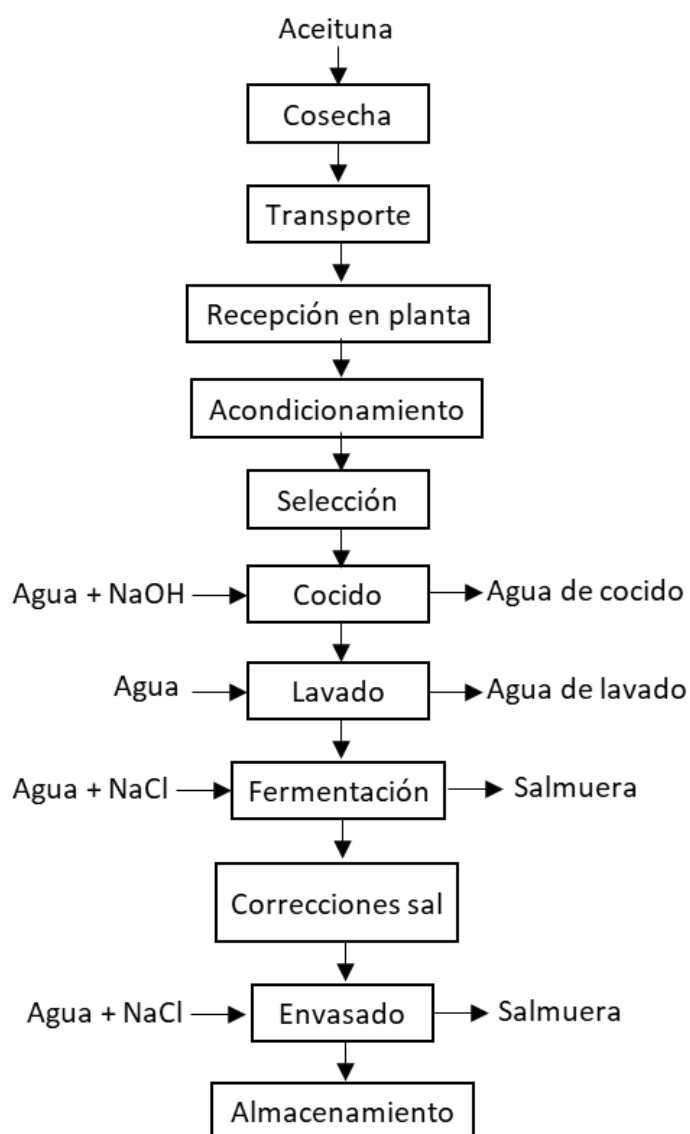


variable, dependiendo de la concentración de lejía utilizada, aunque actualmente hay una tendencia en realizar sólo uno durante unas 12-15 horas o incluso ser sustituido por otros agentes más fácilmente gestionables como el hidróxido de potasio (KOH) (García-Serrano y col., 2020), consumiéndose generalmente entre 0,5 – 1 L/kg de aceituna, en las fábricas más eficientes.

- Finalmente se colocan en salmuera y se produce la fermentación láctica, permitiendo la conservación del producto final, preservando las aceitunas de posibles deterioros, debido a la proliferación de microorganismos que producen alteraciones, e incluso promoviendo una adecuada fermentación a través de cultivos iniciadores (Bautista-Gallego y col., 2011). El consumo de salmuera en el proceso es de aproximadamente 0,5 L/kg de aceituna. En los casos de las empresas fraccionadoras, se consumen 0,5 L/kg más de salmuera para obtener el producto final.
- Subproductos generados en la industria de la aceituna de mesa.

Dentro del procesado de la aceituna existen algunos puntos donde se generan efluentes residuales, como son el lavado del fruto, el cocido, los lavados tras el cocido, la salmuera de fermentación, el deshuesado y relleno y el envasado en salmuera. Entre ellos, cabe destacar bajo el punto de vista de su gestión como vertido al cocido, los lavados y la salmuera de fermentación (**Figura 6**), las dos primeras de tipo alcalino y la última de carácter ácido. En el caso de las aguas de cocido o lejía alcalina y las aguas de lavado, que se usan para retirar dicha lejía de las aceitunas, son efluentes que se generan en menor cantidad y a elevados valores de pH. Su almacenamiento en balsas posibilita que en pocos meses disminuya el pH y pueda ser más fácil la aplicación de sistemas físico-químicos

para su completa depuración, habilitándolo para su vertido industrial o incluso para riego (García-García y col., 2014).



**Figura 6.** Esquema de proceso de aceituna verde aderezada y los principales puntos de generación de efluentes líquidos.

En el caso de las salmueras su depuración supone un problema debido a la elevada concentración en cloruro de sodio (NaCl) o sal. Actualmente se han realizado muchos trabajos y la administración incide sobre la industria para reducir el volumen generado de

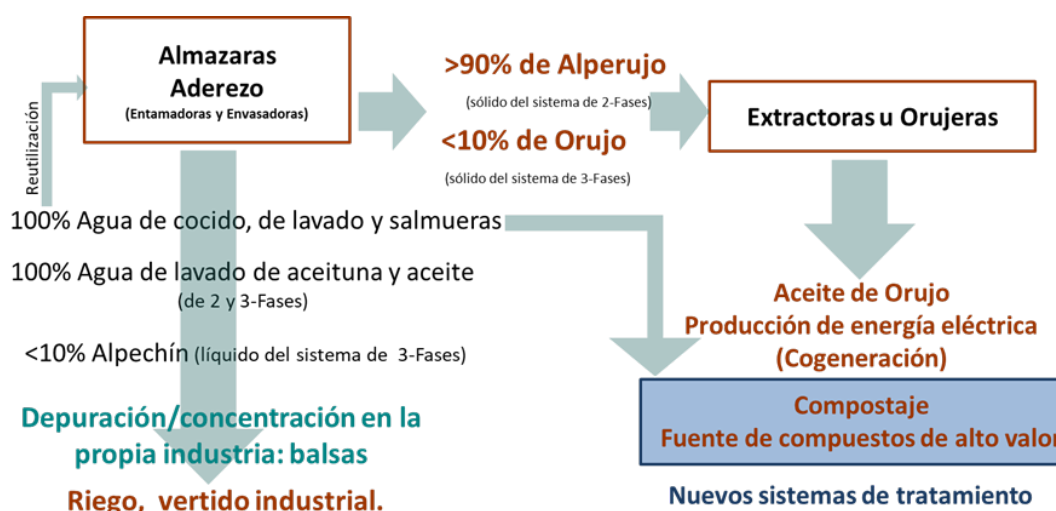
efluentes líquidos. Son varios puntos que se están teniendo en cuenta, un mejor control de las autoridades sobre los vertidos y sobre el consumo de agua, la reducción de efluentes, la separación de los distintos tipos para tratarlos de forma separada de forma más eficiente, y nuevos sistemas de depuración. Para la reducción de los efluentes se está procediendo a reutilizar las salmueras (Garrido y col., 1992) y las aguas de cocido, lo cual puede llevar a reducir el volumen generado a niveles de 2-3L/kg de aceituna. También se está estudiando el disminuir el uso de la NaCl a través del uso de otras sales cloradas (Bautista-Gallego y col., 2011). A nivel industrial, el uso de sal se disminuye suplementándola con ácido acético, y en algunas empresas incluso prescinden de la sal y conservan en agua acidificada. También se generan otros residuos o subproductos en común con la industria olivarera como la hoja y los derivados de la poda del olivar, que en conjunto se denomina hojín. Éste se genera como parte de la limpieza de la aceituna antes de su procesado, aunque en menor cantidad que en el caso de la aceituna recolectada para producción de aceite que se realiza de forma mecánica y/o por vareo. El hojín tiene los mismos destinos que en el caso de la industria del aceite de oliva, alimentación animal, generación eléctrica o cogeneración en plantas de biomasa y la incorporación directa a los suelos por los agricultores, aunque poco a poco va creciendo su interés como materia prima de componentes bioactivos.

En las entamadoras también se encuentran como subproductos los huesos y las aceitunas de destrío que se usan para la obtención de aceite oliva en las almazaras de destrío, en donde se obtendría un alperujo que es aprovechado igual que el alperujo de almazaras de aceite de oliva virgen. El hueso es reenviado a las almazaras donde se emplea como biomasa para las calderas o se comercializan como biocombustible natural doméstico.

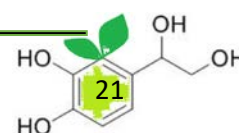
## 1.2. Compuestos de alto valor añadido en la aceituna.

En muchos procesos industriales se generan ingentes cantidades de subproductos, por lo que se hace necesario encontrar procesos que sean técnica y económicamente viables que mejoren su gestión a través de una eficiente recuperación de sus componentes. Los procesos de elaboración marcan el tipo de efluente que se genera, siendo sin duda los efluentes líquidos los más importantes tanto por cantidad como por su contenido orgánico, y por tanto constituyen muchos de ellos un verdadero problema medio ambiental, aún sin resolver. Sin embargo, su carácter fitotóxico ofrece una ventaja más importante, la presencia de componentes con elevada actividad biológica, entre los que destacan, una vez más los compuestos fenólicos junto con los triterpenos y los derivados del ácido elenólico (Medina y col., 2007).

Entre los principales subproductos y efluentes que se generan en las dos principales industrias de la aceituna como son la del aceite de oliva y la aceituna de mesa cabe destacar al alperujo en la primera y a las aguas de cocido, lavado y salmueras en la segunda, como se ha comentado anteriormente y como se aprecia en la **Figura 7**.



**Figura 7.** Principales subproductos y efluentes generados en la industria del aceite de oliva y la aceituna de mesa, así como sus principales canales de gestión.

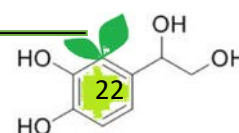


La generación de residuos en la industria de la aceituna (líquidos y sólidos) supone un verdadero problema para el entorno. En el caso del aceite de oliva se producen entre 3 y 4 millones de toneladas al año de alperujo, mientras que en la aceituna de mesa se generan más de 500.000 m<sup>3</sup> de efluentes líquidos al año (<https://www.mapa.gob.es>).

Los efluentes líquidos de ambas industrias son procesados para su depuración o evaporación buscando su vertido industrial o su uso como agua de riego. En el caso de los subproductos sólidos se gestionan fundamentalmente para la extracción del aceite de orujo y para la generación de energía eléctrica en las centrales de cogeneración. Sin embargo, en los últimos años está creciendo el interés de éste para la obtención de compost y sobre todo como fuente de obtención de compuestos bioactivos de alto valor añadido para su uso en alimentación, farmacología y cosmética.

Otro sector que está ganado interés es el desarrollo de nuevas tecnologías que permitan mejorar el aprovechamiento energético de los subproductos sólidos o semisólidos, basados en dos vías, la termoquímica o vía seca, mediante alguno de los procesos de combustión, pirólisis, gasificación o licuefacción, y mediante vía bioquímica, principalmente utilizando procesos de metanización o bien por hidrólisis y fermentación (Mateo y col., 2013). El aprovechamiento de los componentes bioactivos no se plantea como una alternativa a estos procesos, sino como un paso previo que permite, en algunos casos el mayor aporte de valor en la nueva gestión de los subproductos.

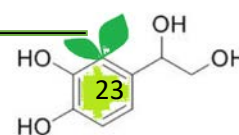
Durante el procesado del aceite de oliva el 98 % de estos compuestos pasan al alperujo, quedando en el aceite tan solo un 2 % de su peso total. Algo similar ocurre con los efluentes de la industria de la aceituna de mesa, en donde también está creciendo el interés por la extracción de los componentes bioactivos que portan. Los subproductos generados en ambas industrias comparten la gran mayoría de compuestos bioactivos. Estos incluyen alcoholes alifáticos, triterpenos, esteroides, hidrocarburos, carotenos y compuestos



polifenólicos (Reboredo-Rodríguez y col., 2017) que tienen innumerables propiedades biológicas como antioxidantes, antiinflamatorios, antibacterianos y anticancerosos entre otros. A su vez, contienen una elevada carga contaminante y se consideran agentes fitotóxicos (Mekki y col., 2007) que, vertidos pueden generar verdaderos desastres naturales. En este sentido la recuperación, aislamiento y purificación de productos de alto valor añadido es una alternativa natural, económica y ecológica que resultaría de una gran ayuda al sector del aceite de oliva. Otras fuentes valiosas para recuperación de estos componentes son las aguas generadas en los procesos de elaboración tanto del aceite (Caporaso y col., 2018) como de la aceituna de mesa como son las aguas de cocido, de lavado y las salmueras (El-Abbassi y col., 2014).

### **1.3 Compuestos fenólicos.**

Los fenoles engloban un amplísimo grupo de compuestos naturales cuyo denominador común es que poseen al menos un grupo fenol en su estructura, es decir, un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo. Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal como ésteres o glucósidos y son los metabolitos secundarios (terpenos, glicósidos, alcaloides y compuestos fenólicos) biosintetizados en las plantas, bien por la ruta del ácido shikímico, por la vía del ácido malónico o por ambas. Su estructura química puede ser muy sencilla como los ácidos fenólicos o formando polímeros de gran tamaño como los taninos y lignanos (Vermerris y Nicholson, 2006). Desempeñan funciones fisiológicas de gran importancia en las plantas como potentes defensores de éstas ante cualquier tipo de ataque o estrés provocado por virus, hongos y bacterias; también actúan como agentes alelopáticos o tienen función estructural prestando soporte mecánico a la planta (Bhattacharya y col., 2010). Tienen un marcado carácter antioxidante en general, ya que gracias a su condición de polifenoles se oxidan con mucha facilidad. Se encuentran distribuidos por toda la planta (tallos, raíces, flores, frutos y semillas), pero suelen

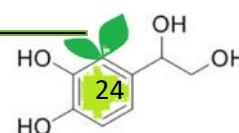


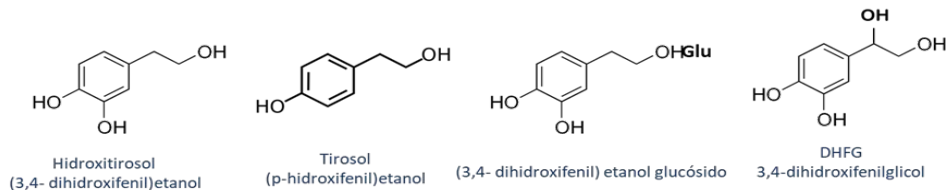
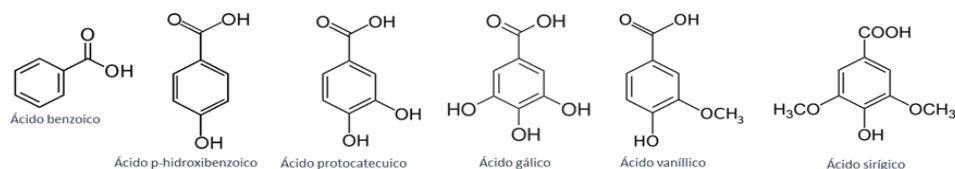
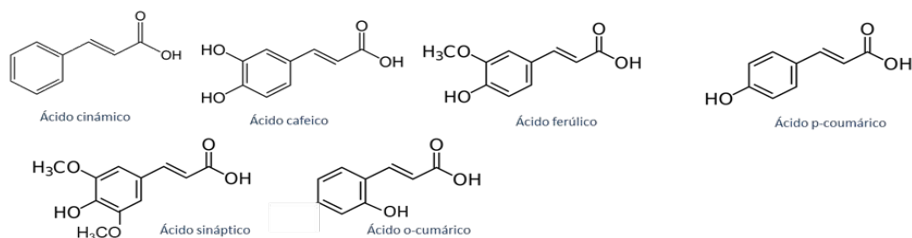
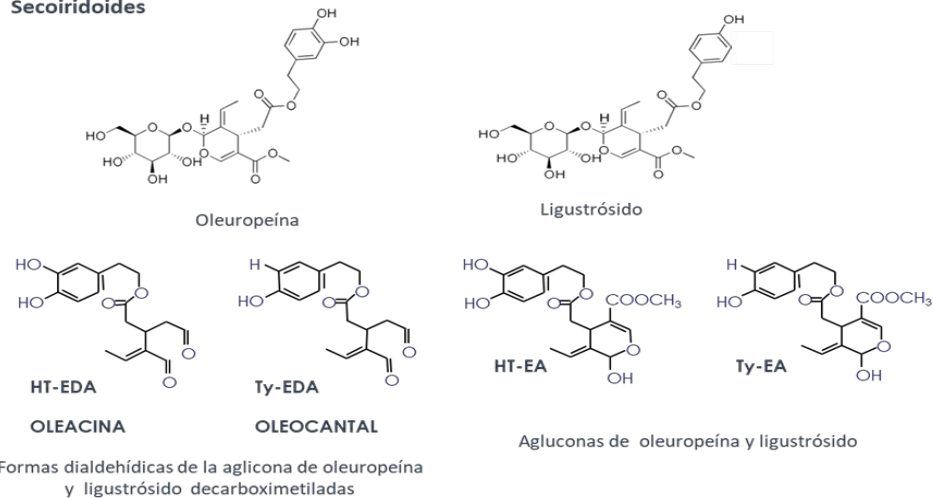
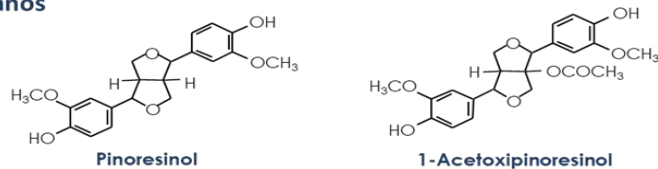
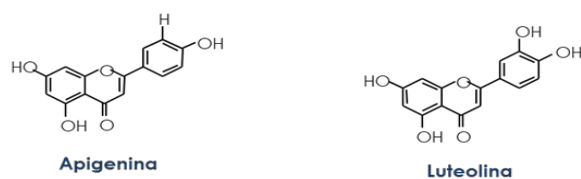
acumularse en mayor cantidad en las capas más superficiales de los vegetales y captan la mayor parte de las radiaciones UV, impidiendo los efectos nocivos de las mismas en los tejidos internos de la planta (Ryan y Robards, 1998). Algunos de ellos son responsables del color de las flores y de muchas de las propiedades beneficiosas de muchas plantas.

### *1.3.1 Clasificación.*

Tanto el olivo como su fruto han sido reconocidos como extraordinarias fuentes de obtención de estos compuestos y se pueden encontrar inherentes en el fruto o formarse durante su procesado (Obied y col., 2005). La aceituna contiene un amplísimo perfil fenólico (Bianchi y col., 2003; Brenes y col., 1999) que depende mucho de la zona de cultivo, de la variedad de la aceituna y de su índice de madurez (Romero y col., 2004). Debido a todos estos factores es complicado determinar el porcentaje de estos compuestos, aunque algunos autores reportan estar entre el 1 y el 3 % del peso en seco de la aceituna (Ghanbari y col., 2012). La aceituna contiene fenoles ácidos, alcoholes fenólicos, secoiridoides y flavonoides (Figura 8).

La oleuropeína es el mayor componente secoiridoide en aceitunas verdes, que es un éster glucósido del 3,4-dihidroxifeniletanol (hidroxitirosol) y ácido elenólico. Están relacionado con el amargor y atributo picante presentes en aceites obtenidos a principios de campaña donde la aceituna está aún verde. Ésta junto al oleósido-11-metiléster y los isómeros de oleuropeína y comselogósido van disminuyendo a medida que el fruto va madurando (Fernández- Poyatos y col., 2021). En paralelo a la disminución de la oleuropeína y cuando el fruto va madurando hay un aumento de la desmetiloleuropeína, de la forma dialdehídica del ácido elenólico unida a hidroxitirosol y del glucósido de hidroxitirosol (Romero y col., 2002a). Además de los anteriores, otros compuestos secoiridoides encontrados en la aceituna son el glucósido del ácido elenólico, el ligustrósido y la forma dialdehídica de la aglicona (Obied y col., 2007).



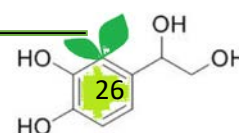
**Alcoholes fenólicos.****Ácidos fenólicos****Ácidos benzóicos (C6-C1)****Ácidos cinámicos (C6-C3)****Secoiridoides****Lignanós****Flavonoides****Figura 8.** Principales componentes fenólicos presentes en la aceituna.



Otro grupo de fenoles que destaca en la aceituna son los alcoholes fenólicos simples como el hidroxitirosol (HT), el tirosol (TY) y el 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG). Son los compuestos fenólicos con mayores propiedades antioxidantes y los más estudiados por sus propiedades biológicas, se ha visto que cuando se produce la extracción del aceite de oliva en frutos más maduros el contenido de éstos aumenta (Brenes y col., 1999). También hay que destacar un grupo importante que se ha detectado en la aceituna que es el de los ácidos fenólicos a los que se asocia cualidades sensoriales y organolépticas (sabor, astringencia y dureza) así como propiedades antioxidantes, dentro de los cuales destacan los ácidos benzoicos (C6-C1) como los ácidos benzoico, p-hidroxibenzoico, protocateico, gálico, vanílico y sirínico; y los ácidos cinámicos (C6-C3) como los ácidos cinámico, cafeico, felúrico, p- y o-cumárico y sináptico (Degdelen y col., 2013). Dentro de la clasificación de los fenoles hallados en la aceituna en una concentración relativamente elevada se pueden encontrar algunos flavonoides como el luteolín-7-glucósido, apigenin-7- glucósido, rutina y quercetina; así como antocianinas como cianidin-3-glucósido y cianidín-3- rutinósido, que aparecen cuando el fruto ha madurado y presenta un color violeta oscuro (Romero y col., 2002b).

### *1.3.2 Métodos de obtención.*

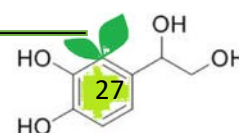
Como se ha comentado ya en este trabajo, la recuperación de los componentes bioactivos presentes en los subproductos de las industrias alimentarias es de enorme importancia desde el punto de vista no solo económico, sino también desde el punto de vista de salud humana, animal y medio ambiental. La mayoría de los métodos de obtención se basan en la extracción a partir de subproductos, aunque cabe mencionar que muchos de ellos se pueden obtener sintéticamente. También hay que destacar que muchos de los obtenidos de esta forma pueden no presentar las mismas propiedades biológicas que los naturales, y por supuesto no inciden en el aprovechamiento industrial de los residuos.



Existen diferentes métodos extractivos usados de manera individual o en combinación con otros que se emplean actualmente para la recuperación de fenoles a partir de muestras de origen vegetal y aguas residuales procedentes de la agroindustria como: las extracciones sólido-líquido y líquido-líquido con empleo de disolventes (Rodríguez y col., 2000; Tura y col., 2002; Naczk y col., 2004) avanzados métodos cromatográficos (Fernández-Bolaños y col., 2008; Fernández-Bolaños y col., 2013); concentración selectiva utilizando equipos de filtración (micro, ultra y nano) (El-Abbassi y col., 2014; Petrotos y col., 2014) y ósmosis inversa (Rodrigues y col., 2020) entre los más importantes.

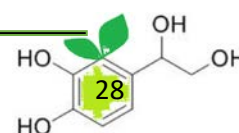
Sin embargo, estas técnicas han experimentado un mayor auge en los últimos años debido al interés suscitado por la recuperación de estos componentes de alto valor añadido y se han desarrollado sistemas tan novedosos que emplean disolventes y sistemas mucho más respetuosos con el medio ambiente como los fluidos supercríticos y subcríticos (Lafka y col., 2011), líquidos presurizados (Xynos y col., 2014; Lama-Muñoz y col., 2020) y disolventes eutécticos (DES) (Ruesgas-Ramón y col., 2017). Muchos de ellos cuentan con los problemas asociados a los elevados costos de inversión, por lo que la industria busca sistemas sencillos de bajo costo tanto de inversión como de operación, lo que limita sustancialmente la tecnología extractiva.

En este sentido, los procesos que han evolucionado a nivel industrial a partir de los subproductos del aceite de oliva, son aquellos basados en el uso de adsorción-desorción o cromatografía líquido- sólido o usando etanol como disolvente. Sin embargo, el uso de sistemas cromatográficos puede ser mucho más ventajoso que los que emplean disolventes, aunque éstos de origen natural como el etanol. En estos sistemas los componentes de interés de la fuente empleada son separados por distribución entre fase sólida (resina) y fase líquida (disolvente orgánico) a través de los procesos de adsorción



y desorción. La fase móvil va atrayendo los diferentes compuestos adsorbidos con distinta velocidad de elución en función de la polaridad de cada uno de ellos. Estos sistemas cromatográficos usan resinas sintéticas de intercambio iónico y normalmente disolventes orgánicos como eluyentes que, si bien proporcionan altos rendimientos, presentan importantes desventajas económicas y son poco respetuosos con el medio ambiente si se hace uso de dichos disolventes. Sin embargo, varios sistemas han sido desarrollados a nivel industrial por haber podido eliminar el uso de estos disolventes para la purificación de HT, resultando sistemas económicos de bajo costo y de alto rendimiento de producción basado en sistemas cromatográficos específicos y de membranas. Este tipo de tecnología es la que ha permitido el desarrollo industrial y comercial de dicho fenol (Fernández-Bolaños y col., 2008a).

La aparición de un nuevo tipo de disolventes “verdes” o disolventes eutécticos profundos (DES) puede llegar a desplazar el uso de los disolventes orgánicos. Los DES son conocidos en la actualidad como los análogos a los disolventes iónicos pero constituidos por productos naturales (Smith y col., 2014), puesto que comparten muchas características con ellos. Estos disolventes son sistemas formados a partir de mezcla de ácidos y bases de Brønsted-Lowry que pueden contener una variedad de especies catiónicas y/o aniónicas. Generalmente se obtiene mezclando una sal de amonio cuaternario con una sal metálica o un donador de enlace de hidrógeno. La reciente aparición de los DES ha posibilitado por primera vez el estudio de la recuperación de compuestos fenólicos presentes en los subproductos del aceite de oliva como la oleaceína y el oleocantal, compuestos recuperados con mayores rendimientos que usando los disolventes orgánicos habituales como el metanol al 80 % (García y col., 2016). Son compuestos muy versátiles y podrían presentar un gran potencial cuando se combinan con pretratamientos térmicos mejorando la extracción de compuestos fenólicos y

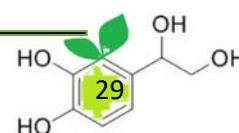


suavizando las condiciones de temperatura y tiempo. Además, su uso disminuye de forma radical el uso de disolventes orgánicos convencionales cuyo uso excesivo puede causar contaminación y riesgo de manipulación por su peligrosidad (Ruesgas-Ramón y col., 2017).

El creciente interés de los DES se basa en la gran capacidad extractiva que poseen y sobre todo en que se pueden obtener una amplia gama de éstos a través de componentes naturales (NADES), muchos de ellos procedentes de subproductos agroindustriales. Permiten, por tanto, la extracción de los componentes bioactivos de una forma sostenible al mismo tiempo que son reutilizables o incluso se puede usar el mismo DES que actuaría como una sustancia vehiculizante que podría mejorar la biodisponibilidad de algunas moléculas activas que hayan sido extractadas. El gran número de citas refleja el potencial de estos disolventes como eficaces extractores de compuestos polifenólicos de los subproductos de la industria del cacao (Panic y col., 2020), de la fresa y de la frambuesa (Vázquez-González y col., 2020), de la uva (Dabetic y col., 2020).

### *1.3.3 Propiedades biológicas de los fenoles*

La importancia de los componentes fenólicos no solo radica en las propiedades funcionales y saludables que su consumo, dentro de una dieta o a través de preparados alimenticios, nutracéuticos o productos de farmacia aporta, sino en los beneficios que sobre el medio ambiente genera su recuperación y las propiedades beneficiosas para la agricultura. En este sentido son muchas las ventajas de recuperar a dichos componentes, ya que permitiría una mejor gestión de los subproductos desde donde son obtenidos, aportando además un extra a la agricultura puesto que podrían llegar a disminuir el uso de productos químicos. Es por ello por lo que este apartado se focaliza en la descripción

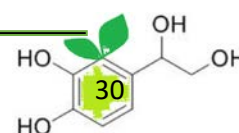


tanto de las principales propiedades biológicas para su uso en alimentación y para su uso agrícola.

- Fenoles en salud humana

Los fenoles se encuentran en la gran mayoría de los alimentos de origen vegetal como el aceite de oliva, la cebolla, el té, el cacao, los dátiles, el vino, etc. Como extraordinarios antioxidantes que son, los fenoles previenen del daño oxidativo que provocan las especies reactivas de oxígeno (ROS), como son los radicales aniónicos hidroxilos, peróxido y superóxidos. Éstos son generados en los organismos aeróbicos como consecuencia de las innumerables reacciones metabólicas que se producen. Estas sustancias influyen en la calidad, aceptabilidad, palatabilidad y estabilidad de los alimentos; ya que provocan peroxidación lipídica que produce rancidez, aparición de sabores y colores inaceptables para el consumidor así como disminución de la vida media comercial del producto. Para evitar estos efectos negativos, los fenoles extraídos de forma natural están desplazando de forma sistemática a los conservantes de origen sintéticos que pueden provocar posible toxicidad o reacciones adversas sobre el organismo humano (Shahmohammadi y col., 2016).

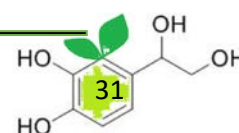
Desde el punto de vista de la salud humana, el daño oxidativo afecta principalmente a las grandes macromoléculas biológicas presentes en los organismos como carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y que se refleja en la aparición de muchas de las enfermedades de origen inflamatorio. La esperanza de vida en humanos ha aumentado de forma muy significativa hasta superar los 80 años, y con ello se han incrementado las enfermedades como diabetes, artritis reumatoides, distrofia muscular, arterioesclerosis, cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas y autoinmunes. Todas estas patologías están íntimamente relacionadas con procesos que provocan daño oxidativo que



genera lo que se denomina estrés oxidativo, estado en el que la velocidad de generación de moléculas conocidas como radicales libres excede la capacidad del organismo de defenderse de ellas. En este sentido, infinidad de estudios epidemiológicos muestran evidencias científicas que atribuyen a los fenoles carácter de antioxidantes y multitud de propiedades beneficiosas para la salud humana. Así, por ejemplo, el consumo de una copa de vino diaria está asociado a la disminución de la probabilidad de sufrir un paro cardíaco por el alto contenido de compuestos fenólicos antioxidantes como el resveratrol (Ferrão y col., 2003). En la cultura asiática la ingesta de la soja está ampliamente extendido en su población, por lo que numerosos estudios relacionan las isoflavonas de la soja con la disminución de problemas asociados a la menopausia en las mujeres puesto que actúan como fitoestrógenos y moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (Messina y col., 2016). También, un gran número de trabajos han asociado la baja incidencia de algunos tipos de cánceres y enfermedades cardiovasculares así como de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer a la ingesta del aceite de oliva y el consumo de aceituna como snack en los países de la cuenca mediterránea, donde el aceite de oliva es la principal fuente de grasas y fenoles (Tripoli y col., 2005).

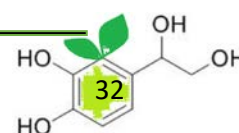
- Fenoles en la agricultura: alelopatía y compuestos aleloquímicos

Para el correcto desarrollo y crecimiento de una planta ésta necesita principalmente luz, CO<sub>2</sub>, agua, minerales y condiciones de temperatura específica para cada especie. Con toda esta amalgama de factores, las plantas podrán generar la materia orgánica necesaria para llevar a cabo sus funciones vitales. Este desarrollo no solo abarca el crecimiento, sino que permite y condiciona la diferenciación celular con respecto a otras plantas. Debido a factores propios de la planta y a otros factores externos, éstas presentan varias rutas en las que se generan metabolitos primarios y secundarios. Dichos metabolitos pueden afectar a la planta o a los organismos vivos que se encuentran cercanos a ellas provocando



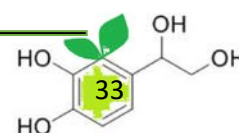
alteraciones en el desarrollo y crecimiento de las mismas. Fenómeno que se conoce como alelopatía. El término alelopatía proviene del griego *allelon*= uno al otro y *phatos*= sufrir, es decir, efecto de uno sobre otro. El botánico checo-austríaco fue la primera persona en utilizar esta terminología en una de sus publicaciones: “The Influence of One Plant on Another: Allelopathy (1937)” (Molish, 1938). Sin embargo, desde la antigüedad se conoce el efecto o cambio que algunas plantas u otras especies (herbívoros o insectos fitófagos) ejercen sobre otras cuando conviven en el mismo ámbito o medio edáfico. Estas alteraciones se producen por liberación de compuestos químicos por parte de un “donador” que afectan a una especie “receptora”. Si el cambio es beneficioso se habla de alelopatía positiva y si éste es un perjuicio se habla de alelopatía negativa. Como se ha mencionado con anterioridad, los fenoles forman parte de este conjunto de metabolitos. Cuando son liberados al medio por ciertas plantas son denominadas especies aleloquímicas y provocando un cambio en su entorno a otras plantas o insectos. Por otra parte, también se habla de forma más general de compuestos fitorreguladores, entendiendo en términos agrícolas, a aquellas moléculas de origen vegetal que ejercen algún tipo de efecto sobre la germinación y/o el crecimiento de las plantas, ya sea inhibiéndolo o activándolo. Por ello consideramos que el término fitorregulador engloba las sustancias alelopáticas.

Es importante destacar que muchas sustancias aleloquímicas producidas por una especie donadora y liberada por la planta al medio (lixiviación, biodegradación, exudación, etc), ejercen su efecto beneficioso a muy bajas concentraciones sobre una especie aceptora, provocando un efecto perjudicial o beneficioso sobre la germinación, crecimiento o desarrollo de ésta última. Sin embargo, cuando se sobrepasa una concentración determinada el efecto se vuelve negativo induciendo un daño.



El origen de las especies aleloquímicas proviene de las rutas metabólicas y son por tanto metabolitos secundarios de las plantas. Su naturaleza abarca gran cantidad de compuestos como lactonas, compuestos alifáticos (ácidos y alcoholes), lípidos y ácidos grasos (ácido linoleico, palmítico, láurico), terpenoides (alcanfor,  $\alpha$  y  $\beta$  pineno, dipenteno), glicósidos cianogénicos (durrina, amigdalina), compuestos aromáticos (fenoles como derivados del ácido benzoico, derivados del ácido cinámico, flavonoides, taninos y fenoles simples (hidroquinonas, arbutina) y esteroides (Inderjit, 1996).

Los agentes aleloquímicos pueden influir sobre las especies receptoras de forma directa (a través del suelo y sus nutrientes) o de forma indirecta (a través de otras plantas o microorganismos e insectos). Debido a la diversidad de la naturaleza de estas especies es complicado detallar un solo mecanismo de acción que explique de manera genérica cómo afectan a la planta receptora. Los agentes aleloquímicos más estudiados son los de naturaleza fenólica. Éstos pueden actuar sobre las plantas provocando cambios en la membrana celular como un aumento de la permeabilidad que puede producir una sobre nutrición, que afecte a la peroxidación lipídica o una disminución de nutrientes, que finalmente produce un crecimiento lento o la muerte del tejido vegetal (Li y col., 2010). También pueden producir efectos sobre las diversas funciones y actividades enzimáticas, como por ejemplo los ácidos clorogénico, cafeico y el catecol que pueden inhibir las actividades de la fosforilasa; el ácido cinámico y sus derivados pueden inhibir las actividades de hidrólisis de la ATPasa; los ácidos tánicos pueden inhibir las actividades de la peroxidasa, la catalasa y la celulasa (Zeng y col., 2008; Polityka y col., 1998), que afectan al crecimiento de las raíces. Del mismo modo, ciertos compuestos fenólicos pueden reducir o inactivar la actividad fisiológica de las hormonas vegetales o fitohormonas, lo que puede inhibir el proceso fisiológico normal de las plantas. Se conocen aquellas que promueven el crecimiento de las plantas: auxinas (AIA: ácido

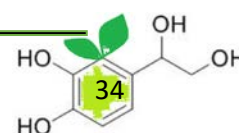




indolacético), citocininas (CQ), las giberelinas (AG: ácido giberélico), el etileno y el ácido abscísico (ABA: ácido abscísico) y las que lo inhiben: el ácido abscísico, los inhibidores, morfictinas y retardantes del crecimiento, cada uno con su estructura particular y activos a muy bajas concentraciones dentro de la planta. Fenoles como el ácido hidroxibenzoico, vainílico, p- cumárico y sirínico actúan inhibiendo el efecto de la hormona AIA por descarboxilación. Por otro lado, fenoles y polifenoles como el ácido clorogénico, cafeico, felúrico y protocateico sinergizan el crecimiento inducido por el AIA, suprimiendo la degradación de la hormona (Macias y col., 2004).

- Influencia de los agentes alelopáticos en la agricultura: alternativa al uso de fitosanitarios

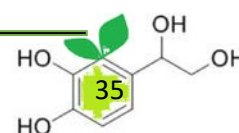
En la última década, el estudio de los efectos alelopáticos se ha convertido en una gran ayuda para la búsqueda de nuevos herbicidas con distintos mecanismos de acción. El crecimiento de malas hierbas afecta de forma directa al rendimiento de los cultivos, por este motivo, el uso de herbicidas sintéticos está ampliamente extendido. Sin embargo, se ha reportado que pueden generar multitud de efectos negativos sobre la salud humana y medio ambiental. Una alternativa al uso de estos compuestos sintéticos es el desarrollo de plaguicidas derivados de principios activos, que se encuentran en las plantas o en metabolitos secundarios de microorganismos, que tienen propiedades fitotóxicas, pero de escasa o nula toxicidad en mamíferos y que pueden ser utilizados en la agricultura ecológica. Sin embargo, el impacto de la alelopatía en la composición y estructura de las comunidades biológicas está relativamente poco investigado en los extractos de olivo. En este contexto, se ha demostrado la capacidad bioherbicida de un extracto fenólico obtenido a partir de aguas residuales de almazara extractado con etanol (Guevara-González y col., 2019) cuyo contenido de fenoles totales fue de entre 50 y 1050 ppm. El efecto fitotóxico se evaluó mediante ensayos de germinación de semillas de trigo



(*Triticum aestivum*) y evidenciaron la eficacia del extracto fenólico con un contenido fenólico de más de 450 ppm frente a un herbicida comercial cuyo principio activo es la Simazina. Por otro lado, estudios sobre la capacidad alelopática de extractos acuosos de la hoja de olivo han demostrado recientemente eficacia sobre la germinación de semillas en *Triticum aestivum* (especie de trigo más extensamente cultivada en el mundo) y *Linum usitatissimum* (especie de lino usada para producción de tejidos) (Zaïri y col., 2020). Los resultados confirmaron que las hojas de *Olea europaea* contienen una sustancia alelopática natural en forma dosis dependiente. Al carecer de toxicidad y ser ricos en compuestos fenólicos, ya sean ácidos fenólicos o flavonoides, los extractos acuosos podrían ser una solución para inhibir la invasión de plantas, lo que los haría útiles para la gestión de programas de biocontrol respetuosos con el medio ambiente. Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para purificar, explorar los mecanismos de acción implicados y dilucidar la estructura de los compuestos activos para el desarrollo de una nueva clase de metabolitos biológicos.

#### 1.4 El 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG)

Uno de los compuestos fenólicos más interesantes, pero menos estudiados que se puede encontrar en la aceituna y en la hoja de olivo es el 3,4- dihidroxifenilglicol (DHFG). Es un fenol simple y estructuralmente muy similar al HT con el que solo difiere en un grupo hidroxilo extra situado en la posición  $\beta$  de la cadena alifática. Fue detectado e identificado por primera vez en 1994 en las fracciones fenólicas de las aguas de vegetación de la aceituna (Bianchi y Pozzi, 1994). También se han encontrado en pequeñas cantidades en aceite de oliva (Medina y col., 2006) y en aceitunas de mesa (Rodríguez y col., 2008). Recientemente ha sido detectado en hoja de pepino tratada de forma foliar con nanopartículas de MoS<sub>2</sub> y TiO<sub>2</sub> (Song y col., 2020). Aunque ya se conocía desde la década de los sesenta cuando se reconoció como el principal metabolito de la noradrenalina



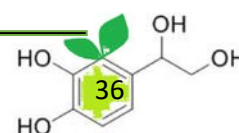
(Sharman, 1969) que funciona en el cerebro como hormona y neurotransmisor. Hormona que se sintetiza en los tejidos cerebrales a partir de la dopamina y tienen una enorme influencia sobre el estado inflamatorio de las neuronas.

Este compuesto fue aislado por primera vez a partir del alperujo (Rodríguez y col., 2009) por el grupo Fitoquímicos, Bioactividad y Desarrollo de Procesos del Instituto de la Grasa (CSIC). Posteriormente, este mismo grupo desarrolló un proceso patentado y altamente adaptado con el que se ha obtenido el DHFG con una pureza que supera el 90% en peso seco a partir de cualquier subproducto de la industria olivarera (Fernández-Bolaños y col., 2008).

#### *1.4.1 Uso del DHFG en la salud humana*

El DHFG es reconocido por su gran capacidad antioxidante, superando incluso la actividad presentada por el ácido ascórbico y el HT en medio acuoso, mientras que en matriz lipídica se puede comparar a la vitamina E presentando mayor actividad que el HT frente a la oxidación primaria y secundaria (Rodríguez y col., 2007) por lo que se pueden emplear para ayudar a proteger de la oxidación lipídica inducida por estrés oxidativo. Además, junto al HT posee una importante sinergia en pruebas realizadas para evitar la agregación plaquetaria, pardeamiento enzimático, actividad antibacteriana e inhibición de la peroxidación de los microsomas hepáticos (De Roos y col., 2011; Rubio-Senent y col., 2015).

Su biodisponibilidad, junto con la de otros compuestos fenólicos, ha quedado reflejada en estudios con ratas, donde se ha demostrado su presencia en tejidos y en sangre. Se alimentaron ratas deficientes en vitamina E a las que se suplementó con  $\alpha$ -tocofenol y extractos fenólicos ricos en HT y DHFG y se comprobó que estos compuestos son capaces

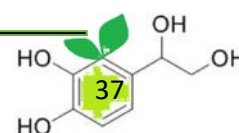


de regular la proteína hepática mitocondrial aldehído deshidrogenasa que presenta un mecanismo oxidante en el tejido hepático (Rodríguez y col., 2012).

Sin embargo, las propiedades farmacocinéticas de los fenoles no son suficientemente eficaces para su correcta adsorción intestinal por lo que es preciso introducir este compuesto en matrices que sí permitan el paso a través de los tejidos. Recientemente se ha comenzado a introducir un nuevo concepto de fibra alimentaria antioxidante donde se produce la unión de distintas pectinas (fibras de azúcares con ácido galacturónico) que forman parte de la pared celular y que se encuentran enlazadas con compuestos de carácter antioxidante como polifenoles y carotenoides. La interacción o complejación de compuestos polifenólicos como el HT y el DHFG con pectinas protegidas mediante encapsulados con gelación iónica probadas *in vitro*, sugieren una relevante mejora del tránsito intestinal, así como la lenta liberación de estas moléculas. De esta manera se puede evitar o disminuir las afecciones que producen inflamación crónica en el colon como Colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Bermúdez-Oria y col., 2017).

Los procesos inflamatorios son respuestas del sistema inmune a un daño que puede ser mecánico (causado por un golpe o fractura), infeccioso (causado por virus o bacterias) o químico (causado por contacto con alguna sustancia nociva) (Prasad y col., 2012). Cuando la inflamación se hace crónica, ésta puede dar lugar a enfermedades producidas por acumulación y activación persistente de células inmunitarias. Cuando se produce esta situación se genera una cascada de citoquinas y otros mediadores inflamatorios que prolonga la vida de los linfocitos y macrófagos (componentes del sistema inmunitario que juegan un papel crítico en los procesos inflamatorios).

Si consideramos la implicación del estrés oxidativo en los procesos inflamatorios, algunos autores han demostrado que el DHFG es una molécula efectiva para combatir el daño oxidativo inducido por LPS, lipopolisacárido que genera una respuesta inflamatoria en

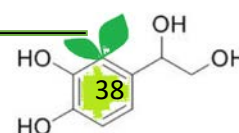


macrófagos peritoneales murinos (Aparicio-Soto y col., 2015), mostrando una considerable actividad antirradical y antioxidante que frena la progresión del daño celular. Además, en este mismo estudio se detectó una disminución significativa de la expresión de las enzimas oxidonítrico sintetasa (iNOS) y ciclooxygenasa (COX-2) implicadas en las rutas inflamatorias cuya disminución podría tener un relevante interés en el campo de la farmacología.

Otros mediadores de la inflamación son las citoquinas que son proteínas de bajo peso molecular sintetizadas en las células como los monocitos, macrófagos, linfocitos, etc y desempeñan un importante papel en la desregularización inmunitaria. Además, pueden activar diversas vías de señalización que conducen a la activación de factores de transcripción, que modulan una serie de pasos diferentes en la cascada inflamatoria en diferentes tipos de células, como las citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$ ). El estudio de la expresión génica de estas citoquinas, así como la exudación por parte de las células macrofágicas tratadas con extractos ricos en DHFG podrían demostrar la capacidad antiinflamatoria de este fenol pudiéndose usar como un futuro fármaco inhibidor de la inflamación.

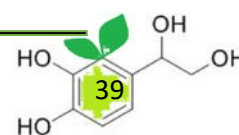
#### *1.4.1 Uso del DHFG en agricultura*

Son muy escasos los estudios realizados con el DHFG en agricultura. Isidori y sus colaboradores (Isidori y col., 2005), analizaron la fitotoxicidad de 15 fenoles comerciales de bajo peso molecular que se encuentran en el alpechín entre los cuales se encontraban el catecol, el HT y el DHFG. A través de pruebas de germinación de semillas de *Cucumis sativus*, *Lepidium sativum* y *Sorghum bicolor*, determinaron que el fenol más tóxico fue el catecol seguido de HT y el DHFG. Sin embargo, que nosotros sepamos, no existen estudios en los que se demuestre estas propiedades en DHFG extractado y purificado de ninguna fuente natural.

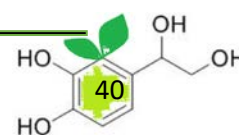


## BIBLIOGRAFÍA

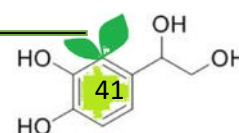
- Alonso-Fariñas, B., Oliva, A., Rodríguez-Galán, M., Esposito, G., García-Martín, J.F., Rodríguez-Gutiérrez, G., Serrano, A., Feroso, F.G. 2020. Environmental Assessment of Olive Mill Solid Waste Valorization via Anaerobic Digestion versus Olive Pomace Oil Extraction, *Processes*, 8, 626.
- Aparicio-Soto, M., Sánchez-Fidalgo, S., González-Benjumea, A., Maya, I., Fernández-Bolaños, J.G., Alarcón de la Lastra, C. 2015. Naturally Occurring Hydroxytyrosol Derivatives: Hydroxytyrosyl Acetate and 3,4-Dihydroxyphenylglycol Modulate Inflammatory Response in Murine Peritoneal Macrophages. Potential Utility as New Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(3): 836–846.
- Bautista- Gallego, J., Arroyo López, F.N., Romero Gil, V, Rodríguez Gómez, F., García García, P., Garrido Fernández, A. 2011. Chloride salt mixtures affect Gordal cv. green Spanish-style table olive fermentation. *Food Microbiology*, 28, 1316-1325.
- Berbel, J and Posadillo, A. 2018. Review and Analysis of Alternatives for the Valorisation of Agro-Industrial Olive Oil by-Products. *Sustainability*, 10(1), 1–9.
- Bermúdez-Oria, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rubio-Senent, F., Lama-Muñoz, A, Fernández-Bolaños, J. 2017. Complexation of Hydroxytyrosol and 3,4-Dihydroxyphenylglycol with Pectin and Their Potential Use for Colon Targeting. *Carbohydrate Polymers*, 163: 292–300.
- Bhattacharya, A., Sood, P., Citovsky, V. 2010. The Roles of Plant Phenolics in Defence and Communication during Agrobacterium and Rhizobium Infection. *Molecular Plant Pathology*, 11(5): 705–19.
- Bianchi, G and Pozzi, N. 1994. “3,4-Dihydroxyphenylglycol, a Major C6-C2 Phenolic in *Olea Europaea* Fruits. *Phytochemistry*, 35(5): 1335–1337.
- Bianchi, Giorgio. 2003. Lipids and Phenols in Table Olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(5): 229–242.
- Brenes, M., García, A., García, P., Ríos, J.J., Garrido, A. et al. 1999. Phenolic Compounds in Spanish Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9): 3535–3540.



- Caporaso, N., Formisano, D., Genovese, A. 2018. Use of Phenolic Compounds from Olive Mill Wastewater as Valuable Ingredients for Functional Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(16): 2829–2841.
- Dabetic, D., Todorovic, V., Panic, M., Redovnikovic, I.R., Sobajic, S. 2020. Impact of Deep Eutectic Solvents on Extraction of Polyphenols from Grape Seeds and Skin. *Applied Sciences*, 10(14): 1–16.
- Dagdelen, A., Gülendaml, T., Mehmet. M., Ekrem D. 2013. Phenolics Profiles of Olive Fruits (*Olea Europaea* L.) and Oils from Ayvalik, Domat and Gemlik Varieties at Different Ripening Stages. *Food Chemistry*, 136(1): 41–45.
- De Roos, B., Zhang, Rodríguez-Gutiérrez, G., Wood, S., Rucklidge, G., Martin, D. R., Duncan, G.J., Cantlay, L.L., Duthie, G.G., O’Kennedy, N. 2011. Anti-Platelet Effects of Olive Oil Extract: In Vitro Functional and Proteomic Studies. *European Journal of Nutrition*, 50(7): 553–562.
- El-Abbassi, A., Kiai, H., Raiti, J., Hafidi, A. 2014. Application of Ultrafiltration for Olive Processing Wastewaters Treatment. *Journal of Cleaner Production*, 65, 432–38.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Senent Rubio, F., Lama-Muñoz, A., Fernández-Bolaños, J.M., Maya, I., López, O., “Method for obtaining Hydroxytyrosol extract, mixture of Hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol extract, and Hydroxytyrosyl acetate extract from by-products of the olive tree and the purification of thereof”. International patent (17/01/2013) N: WO 2013/007850A1.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G, Lama, A., Rodríguez-Arcos, R., Jiménez, A. y Guillén, R. 2008. “Procedimiento de purificación de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) a partir de productos vegetales” N. de solicitud: 200803630 (España: 8/12/2008) CSIC. Su número de solicitud internacional es el PCT/ES2009/070541, está siendo extendida a Europa (EP 09832974.1).
- Fernández-Bolaños, J.G., López, O., Fernández-Bolaños, J., Rodríguez-Gutiérrez, G. 2008. Hydroxytyrosol and Derivatives: Isolation, Synthesis, and Biological Properties. *Current Organic Chemistry*, 12, 442-463.
- Fernández-Poyatos, M. P., Llorent-Martínez, E., Ruiz-Medina, A. 2021. Effect of Ripening on the Phenolic Composition and Mineral Content of Three Varieties of Olive Fruits. *Foods*, 10(2): 380.
- Ferrão, C., Baoshan S., Spranger, M. 2003. Effect of Wine Style and Winemaking Technology on Reveratrol Levels in Wines. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 18(2): 77–91.

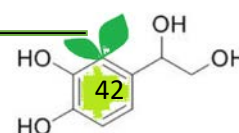


- García, A., Rodríguez-Juan, E., Rodríguez-Gutiérrez, G., Ríos, J. J., Fernández-Bolaños, J. 2016. Extraction of Phenolic Compounds from Virgin Olive Oil by Deep Eutectic Solvents (DESs). *Food Chemistry*, 197: 554–561.
- García-García, O., Arroyo-López, F.N., Rodríguez-Gómez, F. 2017. Partial purification of iron solutions from ripe table olive processing using ozone and electro-coagulation. *Separation and Purification Technology*, 133, 227–235.
- García-Serrano, P., de los Santos, B., Sánchez, A., Romero, C., Aguado, A., García-García, P., Brenes, M. 2020. Progress on green table olive processing with KOH and wastewaters reuse for agricultural purposes. *Science of the Total Environment*, 746, 141-150.
- Garrido, A., P. García, and M. Brenes. 1992. The Recycling of Table Olive Brine Using Ultrafiltration and Activated Carbon Adsorption. *Journal of Food Engineering*, 17(4), 291–305.
- Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K.M., Gilani, A-H., Saari, N. 2012. Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea Europaea L.*)-A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3): 3291–3340.
- Guevara-González, J., Narváez- Flies, C., Marín-Navarrete, A., Gutiérrez- López, J., Troncoso-Troncoso, C. 2019. Bioherbicide from Phenolic Extract Obtained from Almazara Waste. *Scientia Agropecuaria*, 10(4): 497–503.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A. 2005. Model Study on the Effect of 15 Phenolic Olive Mill Wastewater Constituents on Seed Germination and *Vibrio Fischeri* Metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21): 8414–8417.
- Inderjit. 1996. Plant Phenolics in Allelopathy. *Botanical Review*, 62(2): 186–202.
- Lafka, T.I., Lazou, A.E., Sinanoglou, V.J., Lazos, E. 2011. Phenolic and Antioxidant Potential of Olive Oil Mill Wastes. *Food Chemistry*, 125(1): 92–98.
- Lama-Muñoz, A., Rubio-Senent, F., Bermúdez-Oria, A., Fernández-Bolaños, J., Fernández Prior, A., Rodríguez-Gutiérrez, G. 2019. The use of industrial thermal techniques to improve the bioactive compounds extraction and the olive oil solid waste utilization. *Innovative. Innov. Food Sci. Emerg. Technol*, 55, 11–17.
- Lama-Muñoz, A., Contreras, M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., Castro, E. 2020. Content of Phenolic Compounds and Mannitol in Olive Leaves Extracts from Six Spanish Cultivars: Extraction with the Soxhlet Method and Pressurized Liquids. *Food Chemistry*, 320: 126626.

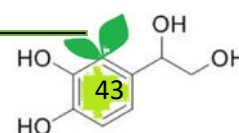




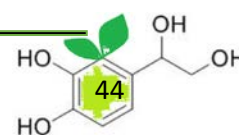
- Li, Z-H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C-D., Jiang, D-A. 2010. Phenolics and Plant Allelopathy. *Molecules*, 15(12): 8933–8952.
- Macias, F. A., Galindo, J.C.G; Molinillo, J.M.C., and Cutler, H.G. 2004. Mode of Allelochemicals Action of Phenolics Compounds In Allelopathy. *RC Press. Allelopathy: Chemistry and Mode of Action of Allelochemicals*, 217–238.
- Mateo, S., Puentes, J.G., Sánchez, S., Moya, A.J. 2013. Oligosaccharides and monomeric carbohydrates production from olive tree pruning biomass. *Carbohydrate Polymers*, 93, 416– 423.
- Medina, E., De Castro, A., Romero, C., Brenes, M. 2006. Comparison of the Concentrations of Phenolic Compounds in Olive Oils and Other Plant Oils: Correlation with Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14): 4954–4961.
- Medina, E., Brenes, M., Romero, C., García, A., De Castro, A. 2007. Main Antimicrobial Compounds in Table Olives. *J. Agric. Food Chem*, 55, 9817–9823.
- Mekki, A., Abdelhafidh, D., Sayadi, S. 2007. Polyphenols Dynamics and Phytotoxicity in a Soil Amended by Olive Mill Wastewaters. *Journal of Environmental Management*, 84(2), 134–40.
- Messina, M. 2016. Soy and Health Update: Evaluation of the Clinical and Epidemiologic Literature. *Nutrients*, 24 (12):754.
- Molisch, Hans. 1938. “Agents Affecting Plant Growth and Movement”, (3568): 3568.
- Naczki, M., Shahidi, F. 2004. Extraction and Analysis of Phenolics in Food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1–2): 95–111.
- Nunes, M.A., Pimentel, F.B., Costa, A.S.G., Alves, R.C., Oliveira, M.B.P.P. 2016. Olive by products for functional and food applications: challenging opportunities to face environmental constraints. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 35, 139–148.
- Obied, H.K., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K., Stockmann, R. 2005. Bioactivity and Analysis of Biophenols Recovered from Olive Mill Waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(4): 823–37.
- Obied, H.K., Peter K., Prenzler, P., Robards, K. 2007. Novel Secoiridoids with Antioxidant Activity from Australian Olive Mill Waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(8): 2848–53.
- Panic, M., Drakula, S., Crovotto, G., Verpoorte, R., Hruskar, M., Redovnikovic, I. R., Radosevic, K. 2020. Biological Activity and Sensory Evaluation of Cocoa By-



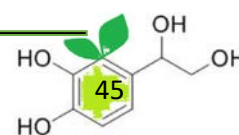
- Products NADES Extracts Used in Food Fortification. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 66, 102514.
- Petrotos, K., Lellis, T., Kokkora, M., Gkoutosidis, P. 2014. Purification of Olive Mill Wastewater Using Microfiltration Membrane Technology. *Journal of Membrane and Separation Technology*, 3(1): 50–55.
- Plaza, C., Nogales, R., Senesi, N., Benitez, E., Polo, A. 2008. Organic matter humification by vermicomposting of cattle manure alone and mixed with two-phase olive pomace. *Bioresource Technology*, 99, 5085–5089.
- Politycka, B. 1998. Phenolics and the Activities of Phenylalanine Ammonia-Lyase, Phenol- $\beta$ -Glucosyltransferase and  $\beta$ -Glucosidase in Cucumber Roots as Affected by Phenolic Allelochemicals. *Acta Physiologiae Plantarum*, 20(4): 405–410.
- Prasad, S., Sung, B., Aggarwal, B.B. 2012. Age-Associated Chronic Diseases Require Age-Old Medicine: Role of Chronic Inflammation. *Preventive Medicine* 54(SUPPL.): S29–37.
- Reboredo-Rodríguez, P., Figueiredo-González, M., González-Barreiro, C., Simal-Gándara, J., Salvador, M.D., Cancho-Grande, B., Fregapane, G. 2017. State of the Art on Functional Virgin Olive Oils Enriched with Bioactive Compounds and Their Properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 668.
- Rodrigues, L.M., Romanini, E.B., Silva, E., Pilau, E.J., Costa, C., Madrona, G.S. 2020. Camu-Camu Bioactive Compounds Extraction by Ecofriendly Sequential Processes (Ultrasound Assisted Extraction and Reverse Osmosis). *Ultrasonics Sonochemistry*, 64, 105017.
- Rodríguez, G., Rodríguez, R., Fernández-Bolaños, J., Guillén, R., Jiménez, A. 2007. Antioxidant Activity of Effluents during the Purification of Hydroxytyrosol and 3,4-Dihydroxyphenyl Glycol from Olive Oil Waste. *European Food Research and Technology*, 224(6): 733–741.
- Rodríguez, G., Lama, A., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillén, R., Fernández-Bolaños, J. 2008. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresource Technology*, 99, 5261–5269.
- Rodríguez, G., Lama, A., Jaramillo, S., Fuentes-Alventosa, J.M., Guillén, R., Jiménez-Araujo, A., Rodríguez-Arcos, R., Fernández-Bolaños, J. 2009. 3,4-Dihydroxyphenylglycol (DHPG): An Important Phenolic Compound Present in Natural Table Olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14): 6298–6304.



- Rodríguez, G., Lama, A., Trujillo, M., Espartero, J.L., Fernández-Bolaños, J. 2009. Isolation of a Powerful Antioxidant from *Olea Europaea* Fruit-Mill Waste: 3,4-Dihydroxyphenylglycol. *LWT - Food Science and Technology*, 42(2): 483–490.
- Rodríguez-Gutiérrez, G., Duthie, G.G., Wood, S., Morrice, P., Nicol, F., Reid, M., Cantlay, L.L., Kelder, T., Horgan, G.W., Fernández-Bolaños, J., De Roos, B. 2012. Alperujo Extract, Hydroxytyrosol, and 3,4-Dihydroxyphenylglycol Are Bioavailable and Have Antioxidant Properties in Vitamin E-Deficient Rats-a Proteomics and Network Analysis Approach. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(7): 1131–1147.
- Rodríguez, I., Llompart, M.P., Cela, R. 2000. Solid-Phase Extraction of Phenols. *Journal of Chromatography A*, 885(1–2): 291–304.
- Romero, C., Brenes, M., García, P., Garrido, A. 2002a. Hydroxytyrosol 4- $\beta$ -D-Glucoside, an Important Phenolic Compound in Olive Fruits and Derived Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 13, 3835–3839.
- Romero, C., García, M., Brenes, M., García, A., Garrido, A. 2002b. Phenolic Compounds in Natural Black Spanish Olive Varieties. *European Food Research and Technology*, 215(6): 489–496.
- Romero, Concepción et al. 2004. Effect of Cultivar and Processing Method on the Contents of Polyphenols in Table Olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(3): 479–484.
- Rubio-Senent, F., De Roos, B., Duthie, G., Fernández- Bolaños, J., Rodríguez-Gutiérrez, G. 2015. Inhibitory and Synergistic Effects of Natural Olive Phenols on Human Platelet Aggregation and Lipid Peroxidation of Microsomes from Vitamin E-Deficient Rats. *European Journal of Nutrition*, 54(8): 1287–1295.
- Ruesgas-Ramón, M., Figueroa-Espinoza, M.C., Durand, E. 2017. Application of Deep Eutectic Solvents (DES) for Phenolic Compounds Extraction: Overview, Challenges, and Opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(18): 3591–3601.
- Ryan, D., and K. Robards. 1998. Phenolic Compounds in Olives. *Analyst*, 123(5) 31–44.
- Sánchez-Moral, P and Ruiz, M.V. 2006. Production of pomace olive oil. *Grasas y aceites*, 57 (1), 47-55.
- Serrano, A., Fermoso, G.F., Alonso-Fariñas, B., Rodríguez-Gutiérrez, G., López, S., Fernández-Bolaños, J., Borja, R. 2019. Performance evaluation of mesophilic semi-continuous anaerobic digestion of high-temperature thermally pre-treated olive mill solid waste. *Waste Management*, 87, 250–257.



- Shahmohammadi, M., Javadi, M., Nassiri-Asl, M. 2016. An Overview on the Effects of Sodium Benzoate as a Preservative in Food Products. *Biotechnology and Health Sciences*, 3(3): 35084.
- Sharman, D. F. 1969. Glycol Metabolites of Noradrenaline in Brain Tissue. *British journal of pharmacology*, 36(3): 523–534.
- Smith, E. L., Abbott, A.P., Ryder, K.S. 2014. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chemical Reviews*, 114(21): 11060–11082.
- Song, C., Jason, M.H., With, C., Zhang, X., Wang, W., Sarpong, K.C., Jamali, Z.H., Zhang, H., Zhao, L., Wang, Y. 2020. Metabolic Profile and Physiological Response of Cucumber Foliar Exposed to Engineered MoS<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> Nanoparticles. *NanoImpact*, 20: 100271.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, Daniela., Giammanco, S., La Guardia, M. 2005. The Phenolic Compounds of Olive Oil: Structure, Biological Activity and Beneficial Effects on Human Health. *Nutrition Research Reviews*, 18(1): 98–112.
- Tura, D., Robards, K. 2002. Sample Handling Strategies for the Determination of Biophenols in Food and Plants. *Journal of Chromatography A*, 975(1): 71–93.
- Vázquez-González, M., Fernández-Prior, A., Bermúdez-Oria, A., Rodríguez-Juan, E., Pérez-Rubio, A.G., Fernández-Bolaños, J., Rodríguez-Gutiérrez, G. 2020. Utilization of Strawberry and Raspberry Waste for the Extraction of Bioactive Compounds by Deep Eutectic Solvents. *LWT - Food Science and Technology*, 130: 109645.
- Vermerris, W., Nicholson, R. 2006. Phenolic Compound Biochemistry Phenolic Compound Biochemistry. *Springer*.
- Xynos, N., Papaefstathiou, G., Gikas, E., Argyropoulou, A., Aligiannis, N., Skaltosounis, A.L. 2014. Design Optimization Study of the Extraction of Olive Leaves Performed with Pressurized Liquid Extraction Using Response Surface Methodology. *Separation and Purification Technology*, 122, 323–330.
- Zaïri, A., Nouir, S., Zarrouk, S., Haddad, H., Khélifa, A. 2020. Phytochemical Profile, Cytotoxic, Antioxidant, and Allelopathic Potentials of Aqueous Leaf Extracts of *Olea Europaea*. *Food Science and Nutrition*, 8(9): 4805–4813.
- Zeng, R.S., Mallik, A.U., Luo, S. 2008. Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry. *Springer*. New York, NY, USA.

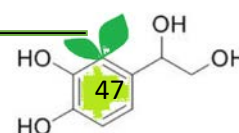


# Objetivos

## Objetivos

El DHFG es un fenol recientemente obtenido y poco estudiado que presenta un elevado potencial bioactivo. Se conoce su gran actividad antioxidante, así como indicios sobre su actividad antiinflamatoria, y por otro lado también se observa una marcada similitud con sustancias alelopáticas con funciones de regulación dentro del crecimiento y desarrollo de las plantas (fitorregulador). El DHFG se encuentra en la aceituna en menor cantidad que el HT, lo cual, y junto con el hecho de que presenta una mayor inestabilidad frente a cambios de pH, temperatura y frente a procesos fermentativos hace más difícil su recuperación y más necesaria la búsqueda de nuevas fuentes para su extracción. Actualmente el único sistema para su obtención permitiría la extracción de un DHFG a unos costos que posibilitaría con dificultad su uso en alimentación, pero no en agricultura. Es por ello, que para el desarrollo de este componente es necesario un estudio más en profundidad de nuevas fuentes, poner a punto un sistema de extracción y purificación más económico y estudiar más en profundidad sus principales propiedades como la antioxidante, la antiinflamatoria y la fitorreguladora.

En la industria del aceite de oliva el principal subproducto en nuestro país es el alperujo o residuo semisólido de la extracción en dos fases. El problema del alperujo radica en la necesidad de aplicar tratamientos térmicos para la recuperación de compuestos fenólicos, tratamientos en donde el DHFG se llega a degradar. En este sentido el reciente auge del uso de los “disolventes verdes”, como los DES, para la extracción de componentes fenólicos podría ayudar a disminuir la temperatura de los tratamientos térmicos, evitando la degradación del DHFG a partir del alperujo.



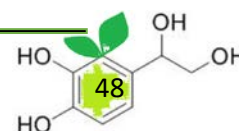
Por otro lado, se han identificado otras potenciales fuentes que precisan de su investigación para la extracción del DHFG, en el caso del aceite de oliva en el alperujo y en la industria de la aceituna de mesa en salmueras y líquido de gobierno tratadas sin sosa al natural, y también en subproductos comunes a ambas industrias como la hoja.

Por otro lado, como se ha mencionado anteriormente, el DHFG cuenta con el inconveniente de ser una molécula que fuera de un rango determinado de pH y de temperatura se desestabiliza, siendo necesario estudiar su estabilización a través del uso de ciertos componentes, encapsulación o adyuvantes para facilitar su obtención y su uso en campo como agente herbicida.

La hipótesis fundamental del presente trabajo se basa en la actividad antioxidante, antiinflamatoria y fitorreguladora de un fenol recientemente encontrado en la aceituna como es el DHFG, que puede ser obtenido de forma sencilla y natural a partir de subproductos procedentes de la industria del aceite de oliva y de la aceituna de mesa. Para hacer realidad la aplicación industrial de dicho fenol es necesaria su obtención de forma sencilla y sin el uso de agentes químicos a partir de una nueva fuente.

A continuación, se enumeran los principales objetivos que se plantean para el desarrollo de la presente tesis doctoral, así como los capítulos, en donde se encuadran cada artículo y patente, en donde son llevados a cabo:

1. Obtención de nuevas fuentes procedentes de los subproductos de la industria del aceite de oliva y de la aceituna de mesa para la producción del fenol DHFG. Desarrollado en los capítulos 1, 2 y 3, a través de tres artículos científicos.
2. Uso de los nuevos disolventes naturales DES en combinación con los actuales tratamientos térmicos para posibilitar dentro de la biorrefinería del alperujo la



obtención del DHFG mejorando la obtención también de otros componentes.

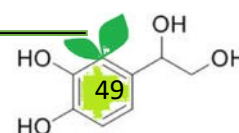
Desarrollado en el capítulo 2 a través de un artículo científico.

3. Estudio de las propiedades biológicas (antioxidantes y antiinflamatorias) de los nuevos extractos de DHFG obtenidos a partir de las fuentes estudiadas.

Desarrollado en los capítulos 1 y 3, a través de dos artículos científicos.

4. Estudio de las propiedades fitorreguladoras del DHFG y mejora de su estabilidad para su uso en agricultura. Desarrollado en el capítulo 4 a través de una patente de invención.

5. Desarrollo de un nuevo sistema más económico sencillo de extracción y purificación del DHFG con baja concentración de HT, que permita su uso agrícola e impulse su uso en alimentación. Desarrollado en el capítulo 5 a través de una patente de invención.





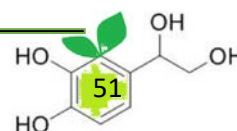
# Marco teórico

## Marco teórico

El marco en el que se encuentran las publicaciones y las patentes se encuadra en la búsqueda de nuevas fuentes, así como de nuevos sistemas de obtención de uno de los fenoles menos estudiados, por su reciente obtención, presentes en la aceituna y con mayor potencial bioactivo, como es el 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG), así como en el estudio de sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y fitorreguladoras que permitan su desarrollo tanto en la industria alimentaria como en la agrícola. La base de este planteamiento radica en tres puntos fundamentales:

- La necesidad de promover un mejor aprovechamiento de los subproductos agroindustriales a través de tecnologías físicas o “green”, y más concretamente de los procedentes de la industria de la aceituna, para minimizar su impacto medio ambiental y llegar a una mejor gestión de un sector clave a nivel nacional y regional.
- La necesidad de obtener alimentos más saludables y funcionales, desplazando el uso de antioxidantes y aditivos ya sean o no naturales obtenidos de forma sintética por componentes naturales obtenidos de forma natural.
- La necesidad de disminuir o incluso eliminar el uso de herbicidas y promotores del crecimiento químicos que afectan no sólo al medio ambiente sino también a la salud del consumidor.

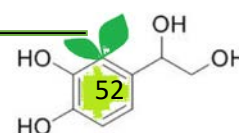
Como es conocido desde la antigüedad, el consumo de aceite de oliva es altamente beneficioso para la salud humana y prueba de ello son los numerosos estudios científicos desarrollados que ponen de manifiesto que la dieta mediterránea, en la cual la principal fuente de grasa poliinsaturada es el aceite de oliva, previene la aparición y desarrollo de enfermedades coronarias, neurodegenerativas, diabetes, obesidad y varios tipos de cáncer



(Castejón y col., 2020). Estos beneficios se atribuyen por un lado al ácido oleico, principal ácido graso monoinsaturado presente en el aceite de oliva; y por otro lado a las propiedades de los componentes minoritarios, entre los que se encuentran los compuestos fenólicos, triterpenos, tocoferoles, fitoesteroles y carotenoides entre otros (Olmo-García y Carrasco-Pancorbo, 2021). Tan solo un 2% de estos compuestos pasan al aceite de oliva, permaneciendo un porcentaje muy elevado en los subproductos generados del procesamiento de la aceituna.

Los fenoles más abundantes encontrados en los subproductos de esta industria son el hidroxitirosol (HT), tirosol (TY) y oleuropeína, así como el más recientemente detectado, el 3,4- Dihidroxifenilglicol (DHFG). Están siendo ampliamente estudiados por sus actividades biológicas como antioxidantes, antiagregantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, antivirales, anticancerosas, cardioprotectoras y antihipertensivas (Benavente-García y col., 2000; Cicerale y col., 2012). A pesar de la importancia de las propiedades de estos componentes, los subproductos generados en la extracción del aceite de oliva se tratan como residuos contaminantes, cuando en realidad constituyen una fuente barata de compuestos bioactivos de alto valor añadido.

España está considerada la mayor potencia mundial en producción y exportación de aceite de oliva alcanzándose una media de producción de cerca de 1,3 millones de toneladas de aceite de oliva anuales, casi la mitad de la producción mundial, que según el Consejo Oleícola Internacional está en torno a 3 millones de toneladas por año. En España, esta industria genera casi 5 millones de toneladas de subproductos cada campaña (<https://www.internationaloliveoil.org>). En la actualidad la extracción del aceite se realiza principalmente por el sistema de centrifugación, en tres o dos fases. El sistema de tres fases genera dos residuos, el alpechín (fase acuosa) y el orujo (fase sólida); mientras que el sistema de dos fases sólo genera uno, el alperujo (semisólido o sólido con una elevada

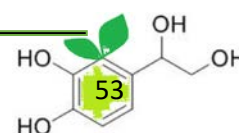


carga de humedad). Estos subproductos son altamente contaminantes debido principalmente a su elevada fitotoxicidad y a causa del notable aumento de la producción y la sensibilidad de la población a los problemas medioambientales durante los últimos años (Rozzi y Malpei, 1996; Azaizeh y col., 2020) y que han llevado a la adaptación y transformación de las estrategias tradicionales de valorización.

Tras el proceso de secado y extracción del aceite de orujo, el alperujo se destina principalmente a la cogeneración de energía eléctrica y térmica mediante combustión (Ruiz-Celma and López-Rodríguez, 2009). Sin embargo, se debería incidir en la búsqueda de otras opciones más respetuosas con el medio ambiente y económicamente viables. Los usos potenciales de los subproductos del aceite de oliva están relacionados con la salud, la cosmética, farmacéuticos, biofertilizantes y/o compost, alimentación animal y con la producción de energía alternativa (biodiesel, gasificación, producción de metano, etc.). En este contexto, las tecnologías de tratamiento de residuos centradas en la recuperación de compuestos bioactivos a partir de los residuos del aceite de oliva, representan una interesante alternativa.

La recuperación de estos compuestos a partir de fuentes como el alperujo radica fundamentalmente en que los tratamientos suelen ser complejos, puesto que la separación de fases y solubilización es todo un reto debido a la estructura de la matriz de la pared celular de la aceituna. Por tanto se hace necesario el uso de tratamientos térmicos con vapor a alta presión y temperatura gracias a los cuales se favorece la formación de una fase líquida enriquecida en componentes de alto interés (Fernández-Bolaños y col., 1999) y de una fase sólida, que a su vez tiene un alto contenido de aceite enriquecido en componentes minoritarios (Lama-Muñoz y col., 2011).

En este sentido, se ha indagado en un nuevo efluente rico en componentes bioactivos como son las aguas generadas en las balsas de almacenaje del alperujo en el sistema de

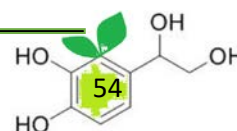


extracción en dos fases, que se va enriqueciendo en estos componentes cuando se añaden aguas de limpieza o procedente de la centrífuga vertical (Lama-Muñoz y col., 2019). En estas aguas se solubilizan parte de los compuestos hidrosolubles presentes en el alperujo y, especialmente el contenido en fenoles se ve claramente aumentado puesto que a estas aguas se adicionan las aguas de centrífuga vertical, de chorreo de tolva y de decantación. Los compuestos fenólicos presentes en las aguas son altamente tóxicos y pueden actuar inhibiendo el crecimiento de ciertos organismos, resultando letales para plantas y animales si alcanzan a ecosistemas acuáticos a través de infiltraciones terrestres. Según la actual legislación, las aguas residuales de almazara deben ser tratadas de forma obligatoria antes de realizar vertidos a otras aguas, pudiéndose usar en riego o volver a incluirlas en el propio proceso de fabricación. Si bien, otra opción es la de la recuperación de estos compuestos a través de procesos que resultan cada vez más viables y económicos.

Otra alternativa para la extracción de componentes de interés del alperujo es la utilización de disolventes orgánicos convencionales. Sin embargo, el uso de grandes cantidades tiene un efecto negativo para el medio ambiente, por eso durante los últimos años se ha buscado otros tipos de disolventes como los disolventes eutécticos profundos (DES) (Chanioti y Tzia, C. 2018; Bonnacci y col., 2020).

El uso de estos nuevos disolventes parece encaminarse a conseguir una mejora no sólo medio ambiental sino tecnológica, puesto que al ser usado en conjunción con tratamientos térmicos mejoran los resultados e incluso disminuyen los requerimientos energéticos de los sistemas con los que se conjuga. Este podría ser el caso del uso de los DES con tratamientos que se están comenzando a utilizar para una mejor gestión de los subproductos, como son los tratamientos térmicos.

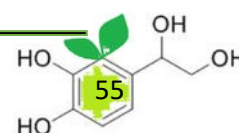
Uno de los objetivos de este trabajo de tesis es la búsqueda de nuevas fuentes procedentes de los subproductos de la industria del aceite de oliva y de la aceituna de mesa para la



producción del fenol DHFG y su purificación. Movidos por las múltiples cualidades del DHFG se ha querido incidir y mejorar en la obtención y purificación de esta molécula y se ha desarrollado un sistema de obtención muy novedoso y protegido bajo patente en el que se consiguen extractos de DHFG muy purificados con la aplicación de un tratamiento térmico y posterior elución de los extractos obtenidos sobre un sistema cromatográfico relleno con resina de intercambio iónico.

También se ha considerado en este trabajo los efluentes generados en la industria de la aceituna de mesa durante la fermentación natural y el almacenamiento en salmuera, salmuera más ácido acético, o una solución de ácido acético. Donde se ha encontrado que se produce una mayor solubilización de fenoles como el HT y el DHFG (Rodríguez y col., 2009). El uso de la salmuera y del ácido por separado o conjuntamente da lugar a diferentes estudios de solubilización de los dos fenoles en función de la variedad de aceituna y del índice de madurez. En cualquier caso, se obtienen fuentes líquidas en las que los fenoles pueden ser extraídos industrialmente. A pesar de que la industria de la aceituna de mesa es estacional, el almacenamiento en salmuera y/o ácido mejoró la solubilización de los fenoles hasta 12 meses, lo que puede utilizarse durante todo el año para la extracción de estos compuestos bioactivos.

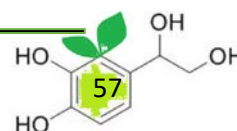
Una de los destinos de estos dos compuestos es su aplicación en el campo de la alimentación y farmacia. Es importante reseñar el esfuerzo que se las autoridades sanitarias y el mundo científico están realizando para reemplazar el uso de aditivos tecnológicos sintéticos por compuestos naturales, preferentemente obtenidos de forma natural, para evitar reacciones adversas en la salud y la presencia de componentes o metabolitos indeseados. Una de las propiedades más estudiadas de los compuestos fenólicos como el HT y del DHFG es su elevada capacidad antioxidante que está estrechamente relacionada con los procesos de estrés oxidativo que actúan sobre las



células afectando de forma negativa y propiciando entre otras enfermedades las de origen inflamatorio (Fitó y col., 2007). Los macrófagos desempeñan un papel importante en la respuesta inmunitaria innata del huésped y están implicados en la aparición de enfermedades causadas por la inflamación. El HT ejerce fuertes efectos antioxidantes y antiinflamatorios y puede aplicarse en el tratamiento de enfermedades como la diabetes, y del tipo cardiovascular implicadas en procesos inflamatorios (Takeda y col., 2014). El estado inflamatorio está regido por una infinidad de mecanismos en los que intervienen proteínas como las citoquinas. Se ha demostrado que una dieta rica en aceite de oliva virgen extra así como la de algunos de sus fenoles previene el desarrollo de enfermedades como la artritis que están asociadas a niveles significativamente más bajos de citoquinas proinflamatorias como  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  e  $\text{IL-17}$  (Impellizzeri y col., 2011). La regulación de la secreción de citoquinas proinflamatorias sobre macrófagos derivados de la línea celular THP-1 es un buen camino para la detección de compuestos que nos ayuden a luchar con este tipo de enfermedades, cuando se les induce un estado inflamatorio exógeno con un lipopolisacárido del tipo LPS. En este sentido, se ha demostrado la capacidad de inhibición de la expresión génica de citoquinas proinflamatorias como las interleucinas  $\text{IL-6}$  e  $\text{IL-1}\beta$ , así como la  $\text{TNF-}\alpha$  o factor de necrosis tumoral que intervienen y promueven eventos inflamatorios. De esta manera, se pueden rescatar estos componentes bioactivos de los subproductos de la industria olivícola para desarrollar formulaciones farmacológicas que nos ayudarían a controlar enfermedades involucradas en procesos inflamatorios.

En cuanto al uso agrícola, la proliferación y el uso indiscriminado de fitorreguladores sintéticos han ocasionado que la normativa agrícola se vea obligada a restringir el empleo de compuestos químicos que provoquen alteraciones y disfunciones hormonales en los cultivos o que resulten tóxicos. Asimismo, el uso intensivo de

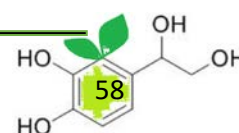
pesticidas químicos para el control de plagas y enfermedades, ha ocasionado que los organismos causales desarrollen resistencia, obligando al uso de dosis cada vez mayores o el desarrollo de productos más tóxicos. Estos aspectos incrementan el nivel de riesgo sobre la salud de los ecosistemas, la salud de los agricultores y el consumidor final. Así, en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad fitorreguladora, se ha dirigido la investigación a la obtención de biomoléculas/extractos de interés a partir de subproductos de la agroindustria, con el objeto de revalorizar dichos subproductos y minimizar el impacto medio ambiental. Permitir de esta manera el desarrollo de una nueva industria biotecnológica cercana y/o dependiente de la agroindustria proveedora de la fuente de los subproductos. Se ha encontrado en el DHFG un efectivo fitorregulador que cumple todas las características necesarias para ser empleado en el cultivo de algunas especies que se ven favorecidas cuando se emplea a muy bajas dosis. Sin embargo, actúa como eficaz inhibir de la germinación en especies de malas hierbas. La producción a gran escala de este compuesto daría un impulso extraordinario al uso de especies naturales para el control de especies indeseadas y como fertilizantes de cultivos tanto en la agricultura convencional como en la ecológica, donde el uso de fitosanitarios está duramente regulado y restringido a compuestos de origen exclusivamente de origen natural.





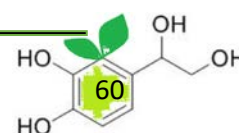
## BIBLIOGRAFÍA

- A.Ruiz Celma., F.López-Rodríguez. 2009. Cogeneration plant in an olive sludge industry. *Applied Thermal Engineering*, 29 (16), 3394-3400.
- Aparicio-Soto, M., Sánchez-Fidalgo, S., González-Benjumea, A., Maya, I., Fernández-Bolaños, J.G., Alarcón-de-la-Lastra, C. 2015. Naturally occurring hydroxytyrosolderivatives: hydroxytyrosyl acetate and 3,4-dihydroxyphenyl-glycol modulate inflammatory response in murine peritoneal macrophages. Potential utility as new dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.*, 63, 836–846.
- Azaizeh, H., Abu Tayah, H.n., Gerchman, Yoram. 2020. Chapter 2 - Valorisation of olive oil industry solid waste and production of ethanol and high value-added biomolecules. *Biovalorisation of Wastes to Renewable Chemicals and Biofuels*, 27-40.
- Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., Del Rio, J.A., 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. Leaves. *Food Chem.* 68, 457–462.
- Bonacci., S., Di Gioia., M.L., Costanzo, P., Maiuolo, L., Tallarico, S., Nardi, M. 2020. Natural Deep Eutectic Solvent as Extraction Media for the Main Phenolic Compounds from Olive Oil Processing Wastes. *Antioxidants*, 9(6), 513.
- Castejón, M.L, Montoya, T., Alarcón-de-la-lastra, C., Sánchez-Hidalgo., M. 2020. Potential Protective Role Exerted by Secoiridoids from *Olea Europaea* In Cancer, Cardiovascular, Neurodegenerative, Aging-Related, and Immunoinflammatory Diseases. *Antioxidants* 9 (2).



- Chanioti, S., Tzia, C. 2018. Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48, 228-239.
- Cicerale, S., Lucas, L.J., Keast, R.S.J., 2012. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr. Opin. Biotechnol*, 23 (2), 129–135.
- D. Impellizzeri, E. Esposito, E. Mazzon, I. Paterniti, R. DiPaola, V. M. Morittu, A. Procopio, D. Britti and S. Cuzzocrea, Oleuropein aglycone, an olive oil compound, ameliorates development of arthritis caused by injection of collagen type II in mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 339, 859–869.
- Fernández-Bolaños, J., Felizón, B., Heredia, A., Guillén, R., Jiménez, A., 1999. Characterization of the lignin obtained by alkaline delignification and of the cellulose residue from steam-exploded olive stones. *Bioresour. Technol*, 68, 121–132.
- Fitó, M., De la Torre, R., Covas, M.I. 2007 Olive oil and oxidative stress. *Molecular nutrition and foods research*, 51 (10), 1214-1224.
- International Olive Oil Production Cost Study. Available online: <https://www.internationaloliveoil.org/wpcontent/uploads/2019/11/INTERNATIONAL-OLIVE-OIL-PRODUCTION-COSTS-STUDY-.pdf> (accessed on 18 January 2020).
- Lama, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rubio-Senet, F., Gómez-Carretero, A., Fernández-Bolaños, J., 2011. A new hydrothermal treatment of alperujo enhances the content of bioactive minor components in crude pomace olive oil. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 1115–1123.

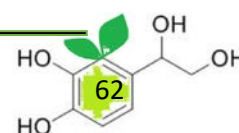
- Lama-Muñoz, A.; Rubio-Senent, F.; Bermúdez-Oria, A.; Fernández-Bolaños, J.; Fernández Prior, A.; Rodríguez-Gutiérrez, G. 2019. The use of industrial thermal techniques to improve the bioactive compounds extraction and the olive oil solid waste utilization. *Innovative. Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 55,11–17.
- Olmo-García, L., Carrasco-Pancorbo., A. 2021. Chromatography-MS Based Metabolomics Applied to the Study of Virgin Olive Oil Bioactive Compounds: Characterization Studies, Agro-Technological Investigations and Assessment of Healthy Properties. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 135: 116153.
- Rodriguez, G.; Lama, A.; Jaramillo, S.; Fuentes-Alventosa, J.M.; Guillen, R.; Jimenez-Araujo, A.; Rodriguez-Arcos, R.; Fernandez-Bolanos, J. 2009.3,4-Dihydroxyphenylglycol (DHPG): An Important Phenolic Compound Present in Natural Table Olives. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 6298–6304.
- Rozzi, A., Malpei, F. 1996. Treatment and disposal of olive mill effluents. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 135–144.
- Y. Takeda, V. N. Bui, K. Iwasaki, T. Kobayashi, H. Ogawaand K. Imai, Influence of olive-derived hydroxytyrosol onthe toll-like receptor 4-dependent inflammatory responseof mouse peritoneal macrophages. 2014. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2014,446, 1225–1230.



# Publicaciones

# Capítulo I

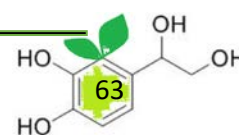
New Liquid Source of Antioxidant Phenolic  
Compounds in the Olive Oil Industry: Alperujo  
Water.



## Resumen Capítulo I

La gestión actual del alperujo como principal subproducto sólido del sistema de extracción de aceite de oliva en dos fases ha dado lugar a la aparición de un nuevo efluente líquido que hasta ahora era tratado junto con el propio alperujo. Según el método tradicional, el alperujo es recogido en las extractoras de aceite de oliva de orujo y es almacenado en grandes balsas al aire libre antes de proceder al secado y someterlo a la extracción del aceite residual. En el período de este almacenamiento, la concentración de fenoles no disminuye, incluso se ve aumentada puesto que en estas balsas se va adicionando otros efluentes líquidos procedentes de la almazara tales como las aguas de centrífuga vertical, aguas de chorreo de tolva o aguas de decantación. Debido a estas adiciones, junto con el agua de lluvia, se forman estanques de agua en la superficie del alperujo que, hasta ahora, se homogeneizaba con el alperujo a tratar en el secadero. Sin embargo, la tendencia actual es que muchas extractoras de orujo empiezan a eliminar esta agua para facilitar el bombeo del alperujo y su posterior secado, y se almacena en otras balsas al aire libre antes de su evaporación y depuración. La aparición de este efluente líquido mejora el secado del alperujo, pero implica un mayor impacto ambiental por la necesidad de construir nuevas balsas de evaporación. En estas aguas se solubilizan parte de los compuestos hidrosolubles presentes en el alperujo, que se pueden extraer sin tratamientos previos, evitando de esta manera problemas medio ambientales provocados por la conocida fitotoxicidad de alguno de ellos, como los fenoles.

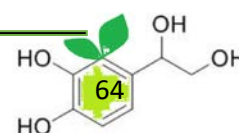
El objetivo de este trabajo fue estudiar la composición y la extracción de los compuestos de alto valor añadido como primer paso de la biorrefinería del agua de alperujo, e identificar a este efluente como una posible fuente de DHFG. La extracción de los compuestos fenólicos disminuye la toxicidad de esta agua, posibilitando la aplicación de



un posterior bioproceso para obtener el aprovechamiento o depuración total de estos nuevos efluentes.

Se tomaron muestras de agua de alperujo de la empresa Oleícola El Tejar Nuestra Señora de Araceli S.C a diferentes profundidades de una balsa de almacenamiento. Se estudió la composición (HPLC con detectores UV y MS) y las propiedades antioxidantes de sus componentes bioactivos mediante métodos que miden la capacidad secuestrante de radicales libres (DPPH), su poder reductor y su capacidad para inhibir la oxidación lipídica en aceites comestibles (método Rancimat). Los análisis mostraron que la concentración de sólidos en suspensión varió entre 1,71 y 8,49 g/L, la grasa total estuvo entre 0,74 y 1,47 g/L, y los fenoles totales se encontraron entre 3,74 y 4,11 g/L, que incluye HT, DHFG y TY como principales fenoles. Se obtuvieron dos tipos de extractos mediante dos sistemas industriales con acetato de etilo y por cromatografía iónica, con un contenido medio en azúcares totales del 2,1% y del 3,16%, fenoles totales de 17,9% y 28,6% e hidroxitirosol de 51,5 y 79,0 mg/g de extracto, respectivamente. La actividad presentada por el extracto cromatográfico fue mayor en términos de capacidad secuestrante de radicales libres, del poder reductor y de la inhibición de la oxidación lipídica. Es por ello por lo que este nuevo efluente acuoso supone una fuente importante para la obtención de extractos ricos en DHFG y HT con alto potencial bioactivo.

La obtención de extractos bioactivos a partir de aguas de alperujo permitiría mejorar la formulación de alimentos con componentes naturales y al mismo tiempo sería el primer paso en una biorrefinería para mejorar la gestión del nuevo efluente.





Article

# New Liquid Source of Antioxidant Phenolic Compounds in the Olive Oil Industry: Alperujo Water

**María África Fernández-Prior, Juan Carlos Pérez Fatuarte, Alejandra Bermúdez Oria, Isabel Viera-Alcaide, Juan Fernández-Bolaños and Guillermo Rodríguez-Gutiérrez \***

Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Campus Universitario Pablo de Olavide, Edificio 46, Ctra. de Utrera, km 1, 41013 Seville, Spain; mafprior@ig.csic.es (M.A.F.-P.); juancarlos.perez@montecec.com (J.C.P.F.); aleberori@ig.csic.es (A.B.O.); iviera@ig.csic.es (I.V.-A.); jfbg@cica.es (J.F.-B.)

\* Correspondence: guirogu@ig.csic.es; Tel.: +34-954-611-550; Fax: +34-954-616-790

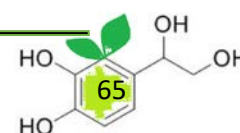
Received: 29 June 2020; Accepted: 20 July 2020; Published: 21 July 2020

**Abstract:** The current management of alperujo as the main solid by-product from the two-phase olive oil extraction system has led to the appearance of a new liquid effluent that until now was treated together with the alperujo itself. The composition and antioxidant properties of its bioactive components at different depths of the pond were studied using colorimetric and HPLC with UV and MS detectors, DPPH, reducing power and rancimat. The concentration of suspended solids varied between 1.71 and 8.49 g/L, total fat was between 0.74 and 1.47 g/L, and total phenols were found between 3.74 and 4.11 g/L, which included hydroxytyrosol, 3,4-dihydroxyphenylglycol and tyrosol as the main phenols. Two types of extracts were obtained through two industrial systems with ethyl acetate and by chromatography, with an average content in total sugars of 2.1 and 3.16%, total phenols of 17.9 and 28.6% and hydroxytyrosol of 51.5 and 79.0 mg/g of extract, respectively. The activity presented by the chromatographic extract was higher in terms of free radical sequestering capacity, reducing power and the inhibition of lipid oxidation. Obtaining bioactive extracts would improve the formulation of food with natural components and at the same time would be the first step in a biorefinery to improve the management of the new effluent.

**Keywords:** olive oil; phenolic extracts; alperujo; hydroxytyrosol; 3,4-dihydroxyphenylglycol; antioxidant; functional foods

## 1. Introduction

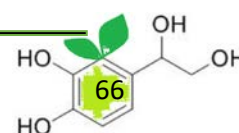
The two most widely used continuous extraction systems in the world for the extraction of olive oil are the three-phase extraction system, in which two by-products are generated, one liquid (alpechín) and one solid (orujo), and the two-phase extraction system in which only one semi-solid by-product called alperujo is generated. The olive oil industry in Spain generates alperujo as its main solid by-product from the two-phase olive oil extraction system. Spain is the greatest producer with a range of 1.2–1.5 MTn/year of olive oil in the last three years [1]. The amount of alperujo generated per year is about 4.8–6 MTn. Alperujo is a semisolid substance with a variable percentage of humidity (60–80%) and high organic content, which makes it very difficult to manage. Initially, when the three-phase olive oil extraction system was replaced by the two-phase system in Spain in the nineties, the alperujo, with a greater content in humidity, replaced the solid waste called orujo (50–55% humidity), thus increasing the environmental and technical problems concerning alperujo management [2]. Nowadays, the main use of alperujo is energy production after the extraction of pomace olive oil [3].





Both for the extraction of the pomace oil and for its final use as fuel, the alperujo must be dried below 10% humidity, which considerably raises the industrial costs [4]. Recycling this kind of compounds from the olive oil industry is in line with the global trends of environmental protection and transformation of waste into useful products that can be used in agriculture, chemical, textile, pharmaceutical and food industries [5]. Many alternatives are emerging at the research level to achieve the reuse of all olive oil by-products. Most of them entail the extraction and recovery of the bioactive components, phenols [6]. Because the major part of the phenols present in the olive fruit (about 98–99%) remain in the alperujo after olive oil extraction, the extraction of bioactive compounds from it is gaining importance as an industrial alternative [7]. Two of the most remarkable water-soluble phenols present in alperujo are hydroxytyrosol (HT) and the 3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG) because of their biological activities [8,9]. HT is one of the most widely studied phenols in the olive for its biological potential, which goes beyond its powerful antioxidant activity, and presents important properties in the prevention against coronary diseases, diabetes, certain types of cancer and inflammatory diseases, among others [10]. Many studies have been focused on the extraction of HT by different methods or even by chemical synthesis [11]. In the case of DHPG, it is a phenol which is very similar in structure to HT and with similar properties. In fact, it has recently been determined that it even exceeds some of the HT activities and in many cases has been found to have a powerful synergistic effect with HT [12,13]. Until a few years ago, this phenol was known to be used as a biomarker of neurodegenerative diseases and a metabolite of noradrenaline [14]. Thanks to its recent development, there are sufficient quantities available to determine its biological potential, such as the prevention of colitis or its anti-inflammatory effect [15]. One of the important properties recently attributed to DHPG is its ability to act as a phyto regulator in the germination and growth of industrial crops in agriculture [16]. The growing demand both at the research and commercial level makes it necessary to search for new liquid sources which facilitate the extraction of these phenols at a reduced cost. The problem is that to extract the phenols from alperujo, it is necessary to apply thermal, chemical or enzymatic treatments that make the process more expensive or even degrade some of the bioactive compounds present such as DHPG. Obtaining new sources would contribute to a better development of HT and DHPG within the field of food and agriculture.

According to the traditional method, alperujo is collected in the pomace olive oil extractors and stored in huge open air ponds before it is dried and submitted for the extraction of the residual oil. During storage in the open air ponds, the concentration in phenolics does not decrease as a consequence of the subsequent drying [17]. Because of the high humidity enhanced by the addition of liquid effluents in olive mills, such as vertical centrifuge waters, water ponds are formed on the surface of alperujo during storage [3]. Until now this water, or alperujo water, was homogenized with the alperujo to be treated in the dryer. Many pomace extractors are now starting to remove this water to facilitate the pumping of the alperujo and its subsequent drying, and it is stored in other open air ponds before its evaporation and depuration. The appearance of this liquid effluent improves the drying of the alperujo but implies a greater environmental impact due to the need to build new evaporation ponds with their own environmental problems. In this water, part of the water-soluble compounds present in the alperujo are solubilized, such as phenolic compounds, which are a potential source of bioactive compounds that could easily be extracted without any pre-treatment. This water is not similar to the water from the three-phase olive oil extraction system (alpechín) because, having been in contact with the pulp for much longer, it has a much higher organic load, and represents a new source of more interesting bioactive compounds than alpechín. On the other hand, phenolic compounds are phytotoxic components that make it difficult to use biological systems for their purification. Therefore, the recent appearance of this effluent may imply serious environmental and management drawbacks at the same time that it could be an interesting source of bioactive compounds. The aim of this work is to study the composition and the extraction of the added-value compounds as a first step of the biorefinery of alperujo water. The extraction of the phenolic compounds diminishes the toxicity of this water, making it possible to apply a further bioprocess to obtain the total utilization or depuration of these new effluents [18].



The alperujo water is stored in 1.5 m deep ponds for up to four months during the olive oil extraction season. It is important to know how its phenolic composition, fat and amount of suspended solids are affected by an average storage period of two months in order to make industrial use of phenols. These factors are important for applying the technologies that currently operate in industry for the extraction of phenols, such as the use of organic solvents like ethyl acetate and chromatographic systems. The depth of the pond can cause a loss in phenolic compounds due to the concentration of oxygen or the incidence of UV light, which also influences the sedimentation of suspended solids and fat [17].

In the present work, we have studied a liquid source from alperujo ponds for the first time, where these phenols are present in soluble form and therefore are more accessible for extraction. We have also studied the effect of the depth of the pond on the phenolic, fat and suspended solid compositions of these alperujo waters in open air evaporation ponds. In addition, the application of two of the most commonly used systems has been studied in order to verify the industrial extraction from this new effluent, and to monitor the antioxidant potential *in vitro* of the extracts obtained.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

The alperujo water samples were taken from the company Oleicola El Tejar Nuestra Señora DeAraceli S.C. which is the industry that processes the largest amount of alperujo in the world through various industrial plants. The samples were taken from three of its main plants located in three different areas of Andalusia, which receive approximately half of the alperujo generated in this region, where more than 35% of the world's olive oil is produced. Samples (25 L) were taken from three different depths in the ponds, the upper part, the middle part (0.75 m) and the lower part (1.5m, (total depth)) from each of the three industrial plants. The three samples from each of the three depths were pooled together to be sufficiently representative. All of them were taken at the end of the 2018/2019 campaign to include alperujo from both the beginning and the end of the season. The storage time of the alperujo water varied, since it had been produced throughout the four months of the campaign, so the average storage time was two months. The samples were all transported on the same day they were taken and stored in 1 and 5 L containers in freezers at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  until use.

### 2.2. Standard Compounds

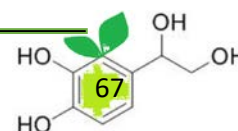
3,4-dihydroxyphenylglycol was obtained from Sigma-Aldrich (Deisenhofer, Germany). Tyrosol was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland) and hydroxytyrosol was obtained from Extrasynthese (Lyon Nord, Geney, France). Standards of gallic acid (GA), trifluoroacetic acid (TFA), anthrone, glucose, Folin-Ciocalteu's phenol reagent, and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Sodium bicarbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), acetonitrile (HPLC grade, hexane and sulphuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )) were obtained from PanreacQuímica S.A. (Barcelona, Spain).

### 2.3. Determination of Insoluble Solids

Approximately one liter of each sample, measuring exactly each volume, was centrifuged in six centrifuge cups at  $15,000\times g$  at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 min in a Sorvall RC-5C refrigerated centrifuge (Du Pont Instruments, Newton, CT) and the solid was separated from the liquid. The solids were joined in a tared rack and left in the oven at  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  until constant weight. Once dry, the grams-per-liter obtained from the suspended solids were quantified for the three samples collected at different depths of the pond.

### 2.4. Determination of Fat in the Separated Solid and Liquid

The solids obtained from the three samples were dried at  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  and crushed in a mortar to break them up. The samples were then weighed, and placed in a Soxhlet to extract the fat [17]. The



difference between the initial and the de-fatted sample was determined by gravimetric analysis to calculate the fat content in each sample.

As for the fat content in the liquid, three successive extractions were made with cold hexane in a decanting funnel from 300 mL of the centrifuged liquid using the same volume of solvent as liquid in each extraction. After separating the aqueous from the organic phase, the hexane from each extraction was combined and introduced into the vacuum evaporator to eliminate the solvent. Finally, the fat content of the liquid was quantified gravimetrically.

#### 2.5. Determination of pH and the Amount of Dry Matter Content of the Samples

The pH of each alperujo water sample was analyzed using a pH-meter model Crison 20 Basic [18]. The amount of dry matter content of the samples was gravimetrically determined. Between 0.5 mL and 2 mL of extract was air-dried and introduced in a desiccator until a constant weight was reached, with the result expressed as milligrams of extract per gram of fresh sample.

#### 2.6. Phenolic Extracts

Two phenolic extracts were obtained at laboratory scale from the liquid fractions by two different methods commonly used at the industrial level:

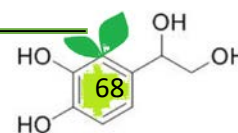
Phenolic extract with ethyl acetate. An organic solvent extraction was carried out by using ethyl acetate in a heating counter-current extraction system for eight hours (Alamo-Ref.:00362000, Spain). For this purpose, 500 mL of ethyl acetate were used for every 200 mL of sample, totaling up to two liters of sample. Basically, the solvent, upon evaporation, passes from the bottom of the sample to the top, back to the heat source where it is again evaporated. Finally, all the ethyl acetate was evaporated under vacuum to obtain the phenolic extracts from each sample.

Phenolic extract obtained by liquid chromatography. An industrial patent was used to produce the second phenolic extract [19]. The liquid phase (2 L) was extracted by ionic resin previously washed with deionized water and activated with a 1% solution of orthophosphoric acid. Finally, the extract was eluted with water and concentrated in a vacuum evaporator at 60 °C, obtaining 5 g of final extract.

#### 2.7. Determination of Single Phenols by HPLC

HPLC-DAD: The samples were analyzed by HPLC-UV and the main individual phenolics were determined, such as 3,4-dihydroxyphenyl glycol, hydroxytyrosol and tyrosol (Ty), among others. All the aliquots of the aqueous extracts were filtered through a 0.45 µm membrane and injected. The analysis was carried out using a HPLC-DAD (Hewlett-Packard 1100 series equipped with a DAD detector and a Rheodyne injection valve with a 20 µL loop). The chromatographic column was a Spherisorb ODS-2 (250 × 4.6 mm internal diameter and 5 µm particle size) from Teknokroma (Barcelona, Spain) kept at room temperature (25 °C) with a pre-column of the same phase. The eluents were milli-Q water (pH adjusted to 2.5 with trifluoroacetic acid) and acetonitrile (HPLC grade) supplied by Teknokroma. The elution method consisted of the following gradient over a total run time of 55 min: 95% A initially, 75% A in 30 min, 50% A in 45 min, 0% A in 47 min, 75% A in 95 min, 95% A in 52 min until completing the run. The equilibrium time was 5 min and the flow rate was 1.0 mL/min. The chromatograms were recorded at 280 nm. The external standards of 3,4-dihydroxyphenylglycol, tyrosol and hydroxytyrosol were used to identify the compounds by comparing retention times and to quantify them by the regression curves.

HPLC-MS: The phenolic compounds present in the extract obtained from the chromatographic system were identified by electron impact mass data collected on a quadrupole mass analyzer (ZMD4, Micromass, Waters Inc.; Manchester, U.K.). Ionization energies of 50 and 100 eV in negative mode and 50 eV in positive mode were used in the electron spray ionization (ESI) mass spectra. The capillary voltage was 3 kV at 200 °C as a desolvation temperature; while the source temperature was 100 °C, and the extractor voltage was 12 V. The flow was 1 mL min<sup>-1</sup> in split mode (UV detector MS). The Kinetex® Biphenyl 100 Å C-18 column (250 mm × 4.6 mm i.d. 5 µm) was used. The mobile phases



used were 0.01% trichloroacetic acid in water and acetonitrile with the above mentioned gradient for HPLC-DAD.

## 2.8. Determination of Total Phenolics by the Folin-Ciocalteu Method

The procedure described by Obied et al. [20] was used. 80  $\mu\text{L}$  of  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  at 0.7 M were added to 20  $\mu\text{L}$  of each of the extracts. Then 100  $\mu\text{L}$  of the 0.2 M Folin solution were added to each well of the plate. After 15 min, readings were taken at 655 nm in a Bio-Rad model iMark microplate reader (Hercules, CA, USA). The results obtained were expressed in gallic acid equivalents, and a calibration line with known gallic acid concentrations was made.

## 2.9. Colorimetric Determination of Total Sugars in the Extracts

The total neutral sugar contents were determined colorimetrically according to the anthrone method [21]. Briefly, each extract was dissolved in an ethanol/water solution (1:1). An aliquot of each dilution of 100  $\mu\text{L}$  (in triplicate) was taken and diluted accordingly and 200  $\mu\text{L}$  of a 0.2% (*w/v*) anthrone solution in concentrated sulphuric acid were added. The test tubes were shaken in a Vortex and heated for 5 min at 100 °C in a water bath. When the tubes were cooled in an ice bath the absorbance was measured at 630 nm in the Bio-Rad microplate reader (Hercules, CA, USA). Glucose was used as an external standard to prepare a calibration with aqueous solutions in a concentration range of 0.02–0.2 mg/mL. The results obtained were expressed as mg of glucose per gram of extract.

## 2.10. Determination of Antioxidant Activity in Vitro

### 2.10.1. Iron Reduction Power

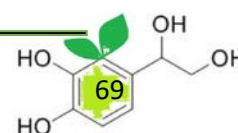
The modification of the method of Psarra et al. [22] was used, using  $\text{FeCl}_3$  as an oxidizing agent. Briefly, the samples were mixed with  $\text{FeCl}_3$  (6 mM in citric acid 5 mM) in quadruplicate, and incubated for 20 min at 50 °C. After that, a bipyridyl solution in 1.2% (*w/v*) trichloroacetic acid was added, and the plate was read at 490 nm after 30 min using a Bio-Rad microplate reader (Hercules, CA, USA). A calibration curve was established to represent the absorbance at 490 nm against a known concentration of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) to express the results. The reducing power (PR) was expressed as Trolox equivalents (mg/L) from the equation obtained by linear regression  $\text{PR} = 0.2172 \times A_{490} - 0.180$ . Measurements of each phenolic extract were made in triplicate together with a blank for each sample.

### 2.10.2. Anti-radical Activity: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH Assay)

The antioxidant activity of each phenolic extract was determined as the free radical-scavenging capacity using the scavenging of DPPH radical method described in a previous study [23]. The reduction of DPPH by antiradical compounds was measured at 515 nm using a microplate absorbance reader model 550 (Hercules, CA, USA). The radical-scavenging capacity of each extract was expressed as EC<sub>50</sub> that represents the concentration in mg/mL at which the oxidation that occurs is reduced by 50%, therefore the lower the EC<sub>50</sub> values, the greater the antioxidant capacity of the sample. EC<sub>50</sub> was calculated from a calibration curve by linear regression for each extract.

### 2.10.3. Determination of Antioxidant Activity in Oil: Rancimat Method

The determination of the oxidative stability of sunflower oil enriched with the phenolic extract was carried out using a 679 Rancimat instrument (Metrohm Ltd., Herisau, Switzerland). The enriched and the control oil samples ( $2.50 \pm 0.01$  g) were weighed into the reaction vessel directly. The temperature of the heating block was set at 90 °C and the air flow was adjusted to 20 L/h. The results were expressed as induction time (IT), which is the time period in which the secondary oxidation products are detected, expressed in hours. It characterizes the oxidation stability of the oils. All determinations were carried out in duplicate.



The lipid matrix was obtained from sunflower oil by purification through alumina to remove the antioxidant compounds [24]. The antioxidant-free oil was stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  under nitrogen gas until use. The enriched oils were obtained by the addition of each extract to the purified sunflower oil, and stirring for 10 min to mix the antioxidants with the oil. The final concentration of the extract was 760 ppm.

### 2.11. Statistical Analysis

The results were expressed as mean values  $\pm$  standard deviations of replicate experiments. STATGRAPHICS® plus software was used for statistical analyses. Comparisons amongst samples were made using one-way analysis of variance (ANOVA) and the least significant difference (LSD) method at the same confidence level. A significance level  $\alpha$  or  $p$  value of  $<0.05$  indicated statistically significant differences.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Raw Material Analysis

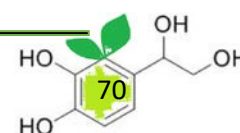
Analysis of the three alperujo water samples (Table 1), corresponding to the three heights (upper, middle and bottom) of the evaporation pond, showed a significant difference in undissolved solid content, increasing with pond depth. The average content was 4.30 g/L, which is not a problem for the use of L/L phenol extraction systems, but is a problem if a chromatographic system is to be used, in which case the use of the corresponding alperujo water would be recommended for the first two heights of the pond where the average solid content does not exceed 2 g/L [19].

**Table 1.** Chemical parameters, suspended solid, fat and phenolics of the alperujo water collected from three different heights of the pond, upper (A), medium (B) and down (C).

Chemical parameters		Different Heights of the Pond		
		A (Upper)	B (Medium)	C (Down)
Suspended solid (g/L)		$1.71 \pm 0.06^c$ *	$2.23 \pm 0.10^b$	$8.49 \pm 0.38^a$
Fat concentration (g/L)				
Fat in solid		$0.15 \pm 0.03^c$	$0.19 \pm 0.02^b$	$0.77 \pm 0.13^a$
Fat in water		$0.59 \pm 0.11^b$	$0.77 \pm 0.07^a$	$0.70 \pm 0.06^b$
Total fat		$0.74 \pm 0.14^c$	$0.96 \pm 0.09^b$	$1.47 \pm 0.19^a$
Phenolic compounds (g/L)				
Total phenols		$3.74 \pm 0.41^a$	$3.91 \pm 0.17^a$	$4.11 \pm 0.22^a$
3,4-dihydroxyphenylglycol		$0.11 \pm 0.02^a$	$0.12 \pm 0.01^a$	$0.12 \pm 0.01^a$
Individual phenolic	Hydroxytyrosol	$1.12 \pm 0.09^a$	$1.27 \pm 0.04^a$	$1.21 \pm 0.01^a$
	Tyrosol	$0.27 \pm 0.04^a$	$0.33 \pm 0.03^a$	$0.31 \pm 0.03^a$

\* Means with the same letter in the same row were not significantly different,  $p < 0.05$ .

The amount of fat increased with the concentration of solids, and the concentration of fat in the liquid was lower on the surface, as in the other two samples. Therefore, the total fat content was higher as the depth of the pond increased. This result is due to the high fat content of the suspended solids, and this solid settles in the pond. The unexpected fact that the fat content in the water is higher at the bottom may be due to the fact that during sample preparation when separating the solids some of the fat contained in the solids passes into the water. It is also important to note that the fat content of the insoluble solid increases with depth, which could be due to oxidative or enzymatic processes favored by an increased presence of light and oxygen causing hydrolysis and oxidation of the lipids in the solid particles. An extraction was carried out by combining the undissolved solids from the three heights and 8.53% of the fat in dry matter was obtained, which is a high enough value to make it feasible to recover this fat at the industrial level through a solvent extraction such as the one usually used in the extraction of alperujo with hexane. It would be recommended to add this solid to the





alperujo itself in order to increase its richness in fat and improve the pomace oil extraction process, avoiding problems of solid permeability to the organic solvent as well.

With regard to the total and individual phenols, there was no significant difference among the three samples. The average value of total phenols was 3.92 g/L, which is an average concentration if compared to olive oil mil waste water (OMWW) or three-phase vegetable water, which can reach values of up to 10 g/L [25]. This water came into contact with the alperujo during its storage and came mainly from vegetation water and water from the vertical centrifuge, which had continued to solubilize simple phenols, mainly HT and Ty. The concentration in HT was relatively high, and comparable to the concentration that was obtained after the application of thermal treatment to the alperujo, or much higher than the concentration of HT present in the OMWW [3]. The HT concentration obtained makes alperujo water a very interesting source for obtaining extracts which are rich in this antioxidant.

Other authors have studied the waters of the three-phase extraction system or alpechin and found that the maximum content of phenols is over 1 g/L, that phenols are degraded with the depth of the pond and with the storage time, reaching a loss of 40% after three months. Despite exposure to light and oxygen in the upper layers or possible anaerobic reactions at the bottom, the amount of total phenols and the three main phenols is not significantly altered in the case of alperujo water. This may be due to the high phenolic concentration, four times higher than in the alpechin, which on the one hand inhibits the development of reactions by microorganisms and, on the other hand, protects during the studied storage time against oxidation [26,27].

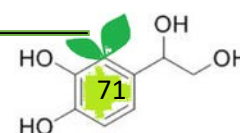
### 3.2. Phenolic Extracts

#### 3.2.1. Characterization of Phenolic Extracts

From the alperujo water, two phenol extractions were carried out by two systems used at the industrial level for the production of HT extracts, by solvent extraction, using ethyl acetate, and by a chromatographic system using ion exchange resin. The values for total and individual phenols as well as total sugars and the amount of extract obtained in each system are shown in Table 2 for the three samples of alperujo water. It can be seen that the amount of extract obtained with solvent was much higher than with resin; while the concentration of phenols and sugars was lower, which showed that chromatography was a more selective process. With respect to the depth of the pond, significant differences can be seen in the amount of extract obtained at the surface and at the bottom for the ethyl acetate extraction as well as significant differences in the concentration of phenols in the extract of top A where both the total phenol content and the concentration of DHPG were significantly higher than in the other extracts. However, there were no differences in the concentration of HT or Ty.

**Table 2.** Chemical parameters, grams of extracts, sugar, total and individual phenolics of the alperujo water extracts collected from three different depths of the pond, for the two extracts obtained from industrial process. Main individual phenolic compounds: 3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG), hydroxytyrosol (HT) and tyrosol (Ty).

Chemical Parameters of the Extracts		Different Depths of the Pond		
		A (Upper)	B (Medium)	C (Down)
Ethyl acetate extract				
g of extract/L of alperujo water		10.65 ± 1.43b *	12.95 ± 2.02ab	14.44 ± 1.77a
Sugars	Total sugar	0.23 ± 0.01a	0.19 ± 0.01a	0.19 ± 0.02a
	(g/g of dry extract)			
Phenolic	% referred to dry matter	2.29	1.93	1.94
	Total phenols	0.19 ± 0.07a	0.17 ± 0.03b	0.17 ± 0.04b
	(g/g of dry extract)			
Individual phenolic	% referred to dry matter	19.42	17.21	17.12
	DHPG	2.71 ± 0.30a	2.04 ± 0.05b	1.21 ± 0.12c



(mg/g of dry extract)		HT	52.91 ± 3.14a	48.37 ± 4.16a	53,23 ± 1,77a
		Ty	24.04 ± 2.33a	18.19 ± 2.07a	20,23 ± 3,91a
Chromatographic extract					
g of extract/L of alperujo water			3.39 ± 0.12	4.05 ± 0.06	3.65 ± 0.19
Sugars	Total sugar				
	(g/g of dry extract)		0.33 ± 0.02a	0.28 ± 0.03a	0.34 ± 0.04a
		% referred to dry matter	3.31	2.83	3.35
Phenolic	Total phenols				
	(g/g of dry extract)		0.33 ± 0.04a	0.26 ± 0.02b	0.26 ± 0.03b
		% referred to dry matter	33.44	26.18	26.25
Individual phenolic	DHPG		0.64 ± 0.02a	0.53 ± 0.06b	1.10 ± 0.11b
	HT		64.89 ± 3.01a	89.27 ± 5.45b	82.84 ± 4.67b
	Ty		34.38 ± 2.18a	31.11 ± 2.50a	32.84 ± 3.07a

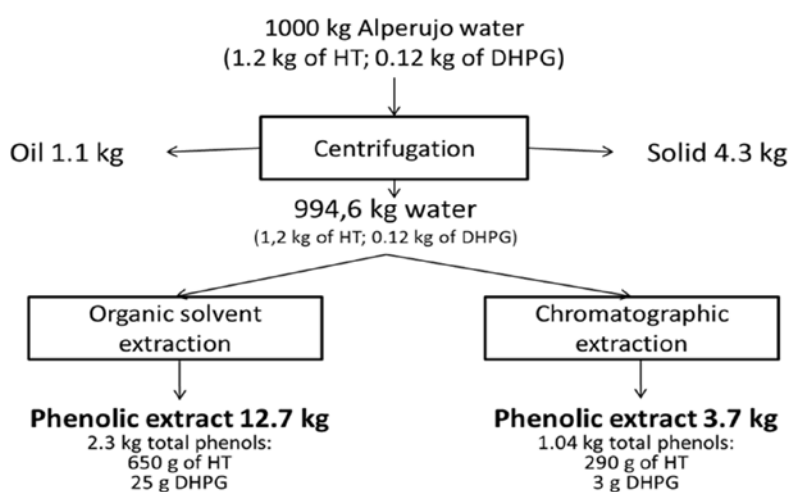
\* Means with the same letter in the same row were not significantly different,  $p < 0.05$ .

In the case of the extracts obtained chromatographically there were no significant differences in the amount of extract obtained or the content in total sugars for the three samples studied. However, there was a lower concentration of HT in the extract of the upper part A, in contrast with the content in total phenols, which was higher. In the same way, the extract which had a higher quantity of DHPG, twice the amount of the rest, was the one obtained from the alperujo waters in the lower part

C. Therefore, the extraction of HT and DHPG was higher at the bottom, which may be due to the fact that the pH in that zone is 5.1, slightly higher than that of the upper and middle parts of 4.5, which favors the adsorption of these simple phenols in the ion resin [19].

Figure 1 shows a mass balance comparing the average extraction from the three depths with the two systems. The solvent extraction produced 3.4 times more extract, which had a lower phenol concentration. The amount of HT was two times higher in the case of the ionic resin extraction. Therefore, the extraction with resin was more selective, although to improve this system it would be necessary to reuse this source several times to extract more phenols. Reuse, together with the environmental advantages of using resins, currently makes this system the most widely used in the industry. From one ton of alperujo water it is possible to obtain 12.7 and 3.7 kg of dry extract with

5.12 and 7.84% of HT and 0.2 and 0.08% of DHPG for solvent and resin extraction systems, respectively. In both cases, this means 5.4 kg of solids containing 1.1 kg of oil and 4.3 kg of solids.



**Figure 1.** Balance of the two extraction systems from alperujo water referring to the overall extract from the three depths.

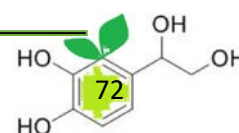
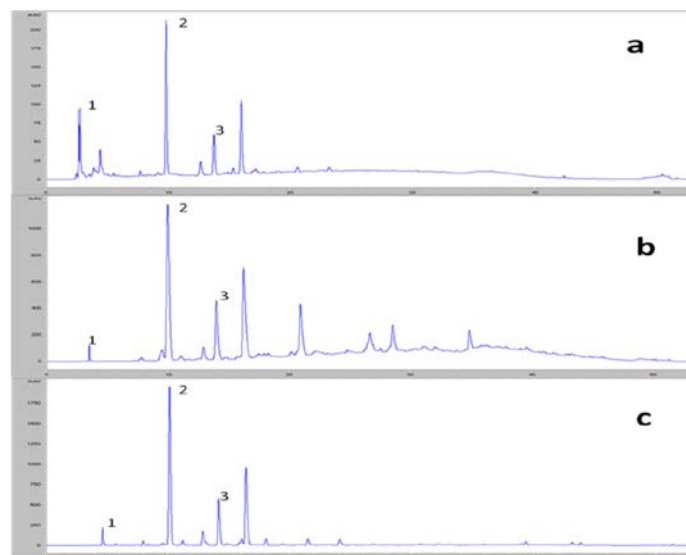


Figure 2 shows the chromatographic profiles of the alperujo water and the two extracts. The profile of the alperujo water was identical to that of the extract obtained with ethyl acetate; only the first peaks at short retention times, corresponding to the organic acid zone, disappeared. However, in the profile of the extract obtained with ionic resin, other peaks appeared after tyrosol in higher concentrations. As the extract obtained with resin was more concentrated in phenols, it was used to identify the rest of the phenols.

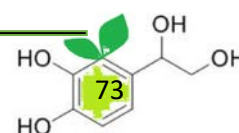


**Figure 2.** Profiles obtained by HPLC at 280 nm for a sample of alperujo water (a), the phenolic extract obtained with resin (b) and the phenolic extract obtained with ethyl acetate (c), identifying DHPG (1), hydroxytyrosol (2) and tyrosol (3).

Therefore, this extract was subjected to fractionation and analysis by liquid chromatography with a mass detector. The extract was dissolved in water and fractionated in the same ion exchange resin column, obtaining ten fractions from F1 to F10. The most representative fractions were analyzed by HPLC-MS to identify their main phenolic compounds. Table 3 shows the results of the identifications and the presence of a large number of phenol derivatives which are abundant in alperujo, coming from the chemical and enzymatic processes which occurred during the storage of alperujo. This profile is similar to the ones found by other authors in olive oil waste water, although in lower concentrations [28,29]. The components with higher molecular weights appeared in the same part of the spectrum and with the same form as polymeric phenolic fractions appeared, according to other authors, which could mean that part of these polymerized phenols was solubilized in the alperujo water [30,31].

**Table 3.** Phenolic compounds identified by HPLC-DAD-MS in the fraction obtained from the phenolic extract by the ionic resin column in comparison to the results obtained by Rubio-Senent et al. [22].

Retention Time (min)	Compounds	Molecular Weight	$\lambda_{max}$ (nm)	m/z
10.20	Hydroxytyrosol	154	214, 234, 278	153, 123
14.25	Tyrosol	138	200, 218, 275	137
15.41	Elenolic acid derivative	242	230	241, 237, 135
16.80	Tyrosol derivative	186	275	185, 151, 137
18.10	Vanillic acid	168	200, 218, 255, 298	167, 108, 45
21.23	Acido 4-Hidroxibenzoico	336	278	335, 215, 153, 125

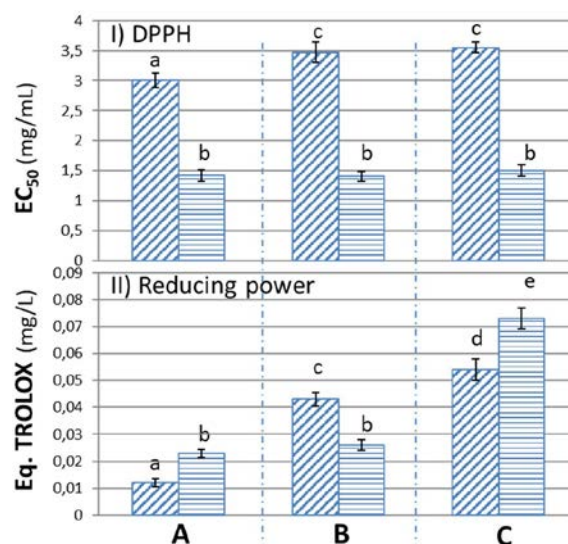




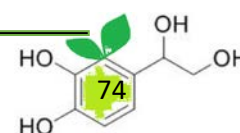
23.60	Hydroxytyrosol derivative	234	278	233, 151, 123
24.78	3,4-Dihydroxyphenylacetic acid derivative	168	214, 234, 278	151, 123, 109, 59
25.53	4 metilcatecol	124	236	123, 107, 69
27.05	Hydroxytyrosol derivative	211	280	210,151, 123, 59,
29.35	Luteolin-7-O-Rutinoside	594	200, 254, 349	593, 447, 285, 151
30.13	Verbascoside	624	198, 328	623, 461, 161
31.92	Oleuropein aglycone derivative	378	200, 222, 280	377, 225, 123
32.58	Oleuropein derivative 1	538	214, 234, 278	537, 377, 287, 257, 211, 123
34.09	Oleuropein derivative 2	378	280	377, 361, 313, 180, 151
36.02	Oleuropein derivative 3	538	280	537, 403, 385, 223, 151, 123
38.07	Unidentified	630	280	629, 303, 187, 123
39.68	Unidentified	630	280	629, 303, 185, 183, 139
39.97	Unidentified	630	280	629, 305, 186,185
42.51	Unidentified	810	280	809, 613, 563, 359, 195, 123,153
42.97	Unidentified	810	280	809, 323, 195, 125,
45.00	Unidentified	810	280	329, 307, 185, 125
46.23	Unidentified	810	280	329, 285, 187, 153

### 3.3. Antioxidant Activity

The anti-radical potential, reducing power and antioxidant capacity in oil were determined invitro to determine the potential application of the extracts obtained (Figure 3 and Table 4).



**Figure 3.** Activities determined by DPPH (I) and reducing power (II) methods of each phenolic extract obtained by solvent (oblique lines) or resin (horizontal lines). Methods I and II were carried out using the three samples obtained from different depths of the pond (upper **A**, middle **B** and lower **C**). Means with the same letters were not significantly different,  $p < 0.05$ .



### 3.3.1. Anti-Radical Potential (DPPH)

The results are expressed as  $EC_{50}$  (Figure 3), which is the concentration of the extracts in mg/mL necessary to inhibit oxidation by 50%, so that the more anti-radical capacity it has, the smaller the amount of it is required to reduce this oxidation by 50%. There was a significant difference between the two groups of extracts obtained by the two systems, with the free anti-radical activity in the phenolic extracts extracted with resin being higher. This may be due to the fact that there was a higher amount of simple phenols, as in the case of hydroxytyrosol, and of total phenols in the extracts obtained with the resin, compared to the extraction with ethyl acetate, in which the extract obtained from the upper sample had significantly higher activity, probably because of its higher concentration in DHPG.

The  $EC_{50}$  values were below those found in the literature [8], which were obtained with a hydroxytyrosol extract of 50% purity in dry weight, corresponding to an  $EC_{50}$  of 3.8 mg/mL. The concentration of HT and DHPG contained in the alperujo water extracts was between 0.16 and 0.008 mg/L, which was in the same order as the  $EC_{50}$  of pure HT according to other authors of 0.11 mg/mL, and well below that found for pure DHPG of 0.17 mg/mL [32]. Therefore, it would be due to the presence or absence of other compounds besides hydroxytyrosol which presented activity and could increase or decrease the anti-radical character of the obtained extracts.

### 3.3.2. Reducing Power (RP)

The results for reducing power show that the activity increased with the depth at which the samples were taken, and that the values were higher in the case of extracts obtained with resin, except for the central zone of the pond. In this case, it was not possible to establish a correspondence with the concentration of simple phenols, with an inverse relationship with the content in total phenols, which decreased slightly. Therefore, the presence of other types of compounds must have justified the activity shown in these tests, whether they were of phenolic origin or other metabolites formed

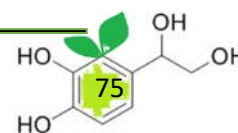
fundamentally at the bottom of the pond during storage.

In this case, the values obtained with these extracts were lower than those shown by the pure HT and DHPG in other works [32]. This is due to the fact that these phenols were found in lower concentrations in the alperujo water extracts. The data obtained would then be compared to those obtained with a natural and a commercial extract of high purity in DHPG, with lower values than the ones shown by other authors for hydroxytyrosol extracts which exceed 50% purity in weight [8].

The higher reducing power observed in the samples from the bottom of the pond may be due to the presence of metabolites formed in a lower concentration of oxygen, or by oxidative degradation at the surface or in the middle zone of the pond. In the case of oxidative degradation, long periods of storage should be avoided, as this may reduce the activity of the extracts and at the same time produce unpleasant odors.

### 3.3.3. Lipid Oxidation (Rancimat Test)

Protection against rancidity, as a measure of antioxidant activity in a lipid matrix (sunflower oil), was tested by the Rancimat method. The three extracts obtained with ethyl acetate on the one hand, and the three extracts obtained with resin on the other hand, were mixed, dried and dissolved completely in sunflower oil which had been previously depleted of its antioxidants.



**Table 4.** Activity determined by Rancimat method of each phenolic extract obtained by solvent or resin from the mixture of the three samples. The induction time of each extract was statistically compared.

Rancimat Test	Concentration (mg/L)	Induction Time (h)	$\Delta IT$ (%)
Control (without extracts)	0	$7.30 \pm 0.03$ b *	-
Solvent extract	760		
Main phenols	DHPG	1.5	
	HT	39.1	$9.23 \pm 0.18$ a
	Ty	15.8	23.4
Resin extract	760		
	DHPG	0.6	
	HT	60.0	$9.85 \pm 0.17$ a
	Ty	24.9	34.9

\* Means with the same letter in the same column were not significantly different,  $p < 0.05$ .

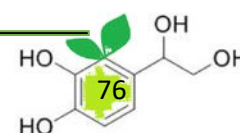
It can be seen in Table 4 that the addition of the ethyl acetate and resin extracts to the oil increased the oxidation induction time by more than 23 and 34%, respectively. Again, the chromatographic extract showed increased activity. Both extracts showed good protection against lipid oxidation of the oil despite low concentrations of HT and DHPG. These results are similar to the values obtained in another work, where a 33% increment in the induction time was obtained using a natural extract which contained 50 ppm of HT in the same edible oil [13]. The same relationship between the increase in oxidation time and the concentration of HT was seen in both extracts. This seems to indicate that the concentration of HT was one of the most important factors to justify this activity. It should also be taken into account that the presence of DHPG improved the HT activity as had already been determined in the above mentioned work where the synergism of the two phenols was established. Therefore, the extracts obtained could serve to improve the shelf-life of refined oils both for direct consumption and for frying, or for heterogeneous foods based on oil emulsions.

#### 4. Conclusions

A liquid phase from the water contained in stored alperujo has appeared in industry, because until now it was homogenized with the alperujo for its treatment. This liquid phase contains a substantial amount of bioactive components such as phenols, among which, HT and DHPG stand out for their biological importance and concentration. The storage period can lead to a variation in the concentration of these phenols and suspended solids depending on the depth of the pond. The presence of solids with a high fat content would allow the recovery of this fat or increase the concentration of fat in the alperujo for its extraction. The application of two industrial processes in the present work shows that it is possible to obtain phenolic extracts with high phenol concentration and antioxidant activity at the industrial level. The extraction of phenolics is gaining importance in the food industry; hence the cost of these extracts is reduced [18]. The extracts can be used for oxidation protection in both aqueous and oily matrices, helping not only to revalue this effluent but also to improve the formulation of new foods based on natural antioxidants, or for nutraceutical or pharmaceutical purposes [13]. It is also important to note that the elimination of phenols from alperujo water would improve the purification of this effluent by promoting the use of this system as a biorefinery, which minimizes its environmental impact [18].

**Author Contributions:** Data curation, M.A.F.-P. and G.R.-G.; Formal analysis, M.A.F.-P., J.C.P.F., A.B.O. and I.V.-A.; Investigation, M.A.F.-P. and G.R.-G.; Methodology, M.A.F.-P., and A.B.O.; Supervision, J.F.B.G.; Writing—original draft, M.A.F.-P. and G.R.-G.; Writing—review and editing, M.A.F.-P., G.R.-G and J.F.-B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

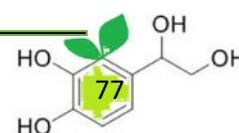


**Acknowledgments:** This research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and co-funded by a European Social Fund (ESF) (project AGL2016-79088R), the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness Ramon y Cajal Programme: (RyC 2012-10456).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

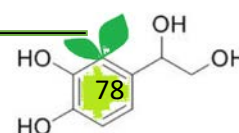
1. International Olive Oil Production Cost Study. Available online: <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/INTERNATIONAL-OLIVE-OIL-PRODUCTION-COSTS-STUDY-.pdf> (accessed on 18 January 2020).
2. Rodríguez, G.; Lama, A.; Rodríguez, R.; Jiménez, A.; Guillén, R.; Fernández-Bolaños, J. Olive stone an attractive source of bioactive and valuable compounds. *Bioresour. Technol.* **2008**, *99*, 5261–5269.
3. Lama-Muñoz, A.; Rubio-Senent, F.; Bermúdez-Oria, A.; Fernández-Bolaños, J.; Fernández Prior, A.; Rodríguez-Gutiérrez, G. The use of industrial thermal techniques to improve the bioactive compounds extraction and the olive oil solid waste utilization. *Innovative. Food Sci. Emerg. Technol.* **2019**, *55*, 11–17.
4. Gomez-de la Cruz, F.J.; Casanova-Pelaez, P.J.; Palomar-Carnicero, J.M.; Cruz-Peragon, F. Characterization and analysis of the drying real process in an industrial olive-oil mill waste rotary dryer: A case of study in Andalusia. *Appl. Therm. Eng.* **2017**, *116*, 1–10.
5. Zrnecvic, S. Evaluation of olive oil mill wastewater. *HrvatskeVode* **2018**, *26*, 75–90.
6. Pantziaros, A.G.; Trachili, X.A.; Zentelis, A.D.; Sygouni, V.; Paraskeva, C.A. A new olive oil production scheme with almost zero wastes. *Biomass Convers. Biorefin.* **2020**. doi:10.1007/s13399-020-00625-0
7. Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, G.; Rodríguez, R.; Guillén, R.; Jiménez, A. Extraction of interesting organic compounds from olive oil waste. *Grasas Y Aceites* **2006**, *57*, 95–106.
8. Rodríguez, G.; Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, R.; Guillén, R.; Jiménez, A. Antioxidant activity of effluents during the purification of hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol from olive oil waste. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *224*, 733–741.
9. Visioli, F.; Davalos, A.; Hazas, M.C.L.; Crespo, M.C.; Tome-Carneiro, J. An overview of the pharmacology of olive oil and its active ingredients. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177*, 1316–1330.
10. Fernández-Bolaños, J.G.; López, O.; Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez-Gutiérrez, G. Hydroxytyrosol and derivatives: isolation, synthesis, and biological properties. *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 442–463.
11. Britton, J.; Davis, R.; O'Connor, K.E. Chemical, physical and biotechnological approaches to the production of the potent antioxidant hydroxytyrosol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 5957–5974.
12. Rodríguez-Gutiérrez, G.; Duthie, G.G.; Wood, S.; Morrice, P.; Nicol, F.; Reid, M.; Cantlay, L. L.; Kelder, T.; Fernández-Bolaños, J.; de Roos, B. Alperujo extract, hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol are bioavailable and have antioxidant properties in vitamin-E deficient rats – a proteomics and network analysis approach. *Mol. Nutr. Food. Res.* **2012**, *56*, 1137–1147.
13. Lama-Muñoz, A.; Rubio-Senent, F.; Bermúdez-Oria, A.; Fernández-Prior, A.; Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez-Gutiérrez, G. Synergistic effect of 3,4-dihydroxyphenylglycol with hydroxytyrosol and  $\alpha$ -tocopherol on the Rancimat oxidative stability of vegetable oils. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2019**, *51*, 100–106.
14. Kielbasa, W.; Lobo, E. Pharmacodynamics of Norepinephrine Reuptake Inhibition: Modeling the Peripheral and Central Effects of Atomoxetine, Duloxetine, and Edivoxetine on the Biomarker 3,4-Dihydroxyphenylglycol in Humans. *J. Clin. Pharmacol.* **2015**, *55*, S80.
15. Sanchez-Fidalgo, S.; Villegas, I.; Aparicio-Soto, M.; Cardeno, A.; Rosillo, M.A.; González-Benjumea, M. Arset, A.; López, O.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J.G.; Alarcón de la Lastra, C. Effects of dietary virgin olive oil polyphenols: hydroxytyrosyl acetate and 3, 4-dihydroxyphenylglycol on DSS-induced acute colitis in mice. *J. Nutr. Biochem.* **2015**, *26*, 513–520.
16. Rodríguez-Gutiérrez, G.; Fernández-Bolaños, J.; García-Borrego, A.; Espejo-Calvo, J.A.; Rojano-Delgado, A.M.; Fernández-Prior, M.A. Uso Del 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) Como Fitorregulador. Spanish National Patent No. P201631404, 3 November 2016.
17. Medina, E.; Romero, C.; Brenes, M. Residual Olive Paste as a Source of Phenolic Compounds and Triterpenic Acids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2018**, *120*, 1700368.



18. Serrano, A.; Feroso, F.G.; Alonso-Fariñas, B.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; Fernández-Bolaños, J.; Borja, R. Phenols recovery after steam explosion of Olive Mill Solid Waste and its influence on a subsequent biomethanization process. *Bioresour. Technol.* **2017**, *20*, 169–178.
19. Fernández-BolañosGuzmán, J.; Rodríguez Gutiérrez, G.; Lama Muñoz, A.; Senent Rubio, F.; Fernández-BolañosGuzmán, J.M.; Maya Castilla, I.; López López, O.; Marset Castro, A. *Method for Obtaining Hydroxytyrosol Extract, Mixture of Hydroxytyrosol and 3,4-Dihydroxyphenylglycol Extract, and Hydroxytyrosol Acetate Extract, from by-Products of the Olive Tree, and the Purification Thereof*; International publication number WO 2013/007850; WIPO: Geneva, Switzerland, 2014.
20. Obied, H.K.; Bedgood, D.R.; Prenzler, P.D.; Robards, K. Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Anal. Chim.* **2007**, *603*, 179–189.
21. Witham, F.H.; Blaydes, D.F.; Devlin, R.M. *Experiment in Plant Physiology*; Van Nostrand Reinhold Co.: NewYork, NY, USA, 1971; p. 245.
22. Psarra, E.; Makris, D.P.; Kallithraka, S.; Kefalas, P. Evaluation of the antiradical and reducing properties ofselected Greek whitewines: correlation with polyphenolic composition. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, *82*, 1014– 1020.
23. Fuentes-Alventosa, J.M.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; Jaramillo-Carmona, S.; Espejo-Calvo, J.A.; Rodríguez-Arcos, R.; Fernández-Bolaños, J.; Guillén-Bejarano, R.; Jiménez-Araujo, A. Extraction method on phytochemical composition and antioxidant activity of high dietary fibre powders obtained from asparagus byproducts. *Food Chem.* **2009**, *116*, 484–490.
24. Yoshida, H.; Kondo, I.; Kajimoto, G. Participation of free fatty acids in the oxidation of purified soybean oilduring microwave heating. *JAOCS* **1992**, *69*, 1136–1140.
25. Mantzavinos, D.; Kalogerakis, N. Treatment of olive mill effluents Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes an overview. *Environ. Int.* **2005**, *31*, 289–95.
26. Saez, L.; Pérez, J.; Martínez, J. Low molecular weight phenolics attenuation during simulated treatment ofwastewaters from olive oil mills in evaporation ponds. *Water Res.* **1992**, *26*, 1261–1266.
27. Kavvadias, V.; Doula, M.K.; Komnitsas, K.; Liakopoulou, N. Disposal of olive oil mill wastes in evaporation ponds: Effects on soil properties. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *182*, 144–155.
28. De Marco, E.; Savarese, M.; Paduano, A.; Sacchi, R. Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chem.* **2007**, *104*, 858–867.
29. El-Abbassi, A.; Kiai, H.; Hafidi, A. Phenolic profile and antioxidant activities of olive mill wastewater. *Food Chem.* **2012**, *132*, 406–412.
30. Capasso, R.; De Martino, A.; Arienzo, M. Recovery of the metal polymeric organic fraction (polymerin) from olive oil mill waste waters. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2846–2855.
31. Rubio-Senent, F.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; Lama-Muñoz, A.; Fernández-Bolaños, J. Chemical characterization and properties of a polymeric phenolic fraction obtained from olive oil waste. *Food Res. Int.* **2013**, *54*, 2122–2129.
32. Rubio-Senent, F.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; Lama-Munoz, A.; Fernández-Bolaños, J. New phenolic compounds hydrothermally extracted from the olive oil by-product alperujo and their antioxidative activities. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 1175–1186.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



# Capítulo II

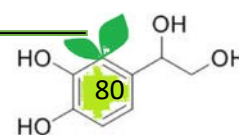
Deep eutectic solvents improve the biorefinery of alperujo by extraction of bioactive molecules in combination with industrial thermal treatments.

## Resumen Capítulo II

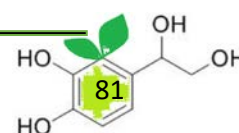
El uso de pre-tratamientos térmicos sobre los subproductos del aceite de oliva representa una alternativa interesante que posibilita el diseño de una biorrefinería para el aprovechamiento integral del alperujo. Estos tratamientos se están comenzando a extender a nivel industrial permitiendo la separación de fases y el aprovechamiento de sus principales componentes (celulosa, hemicelulosa, sustancias pécticas y lignina). Además, se consigue la solubilización de los compuestos bioactivos, lo que facilita la recuperación de productos de alto valor añadido como el hidroxitirosol, 3,4-dihidroxifenilglicol, manitol, polisacáridos hemicelulósicos y oligosacáridos con interesantes propiedades funcionales. Por otro lado, el tratamiento térmico permite la reducción de la fase sólida con un alto contenido en aceite rico en componentes menores.

Otra alternativa para la extracción de compuestos de interés es mediante el uso de disolventes orgánicos convencionales, que, aunque muy efectiva, es una técnica que puede llegar a ser altamente perjudicial para el medio ambiente si se usan grandes cantidades de estos. Por este motivo, es de notable interés el uso de disolventes verdes como los disolventes eutécticos profundos (DES). Recientemente, se ha demostrado que el empleo de los DES para la extracción de compuestos fenólicos en el aceite de oliva es absolutamente viable en comparación con el método clásico de extracción metanol/agua, consiguiéndose no solo una mejora tecnológica, sino también un impacto muy positivo sobre el medio ambiente puesto que además reduce considerablemente el consumo energético.

El objetivo de este trabajo fue emplear la combinación de DES con los tratamientos térmicos donde se demuestra la mejora de la extracción de los componentes bioactivos en el alperujo y posibilita la reducción de las temperaturas utilizadas, el ahorro energético y



la disminución de la degradación de los componentes de interés, posibilitando al mismo tiempo la posterior aplicación de bioprocesos para el aprovechamiento total de este subproducto. Un primer cribado permitió definir una mezcla eutéctica de cloruro de colina, ácido glicólico y oxálico (DES9) como uno de los disolventes adecuados para aumentar la solubilización de fenoles y azúcares, con una reducción de la temperatura de 180 °C a 120 °C. DES9 aumentó la concentración de azúcares ácidos en seis veces y la concentración de hidroxitirosol en 30 veces, hasta 85,81mg/g de materia seca. Se ha demostrado simultáneamente que la actividad del DES9 no se debe a la actividad de cada componente por separado ni a la mezcla de los dos ácidos, sino a la mezcla eutéctica de todos ellos. En el futuro, estos disolventes podrían mejorar la extracción, la estabilidad y la biodisponibilidad de los compuestos biológicos y por tanto, suponen un aporte importante a la biorrefinería del alperujo.







Contents lists available at ScienceDirect

## Food and Bioproducts Processing

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fbp](http://www.elsevier.com/locate/fbp)IChemE  
ADVANCING  
CHEMICAL  
ENGINEERING  
WORLDWIDE

# Deep eutectic solvents improve the biorefinery of alperujo by extraction of bioactive molecules in combination with industrial thermal treatments

**María África Fernández-Prior, Akram Charfi, Alejandra Bermúdez-Oria, Elisa Rodríguez-Juan, Juan Fernández-Bolaños, Guillermo Rodríguez-Gutiérrez\***

*Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Campus Universitario Pablo de Olavide, Edificio 46, Ctra. de Utrera, km. 1 - 41013, Seville, Spain*

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 14 August 2019

Received in revised form 24 January 2020

Accepted 1 February 2020

Available online 7 February 2020

## Keywords:

Deep eutectic solvent

Phenols

Hydroxytyrosol

Olive oil

By-product

Alperujo

## ABSTRACT

Thermal treatments are the latest developments in the olive oil biorefinery industry to extract bioactive compounds from its by-products, mainly the alperujo. To reach these goals and reduce energy consumption the utilization of deep eutectic solvents has been studied. An initial screening led to define a eutectic mix of choline chloride, glycolic and oxalic acid (DES9) as one of the adequate solvents to increase the solubilization of phenols and sugars, with a temperature reduction from 180 °C to 120 °C. DES9 increased the concentration of acid sugars by six times and the concentration of hydroxytyrosol by 30 times, to up to 85.81 mg/g of dry matter. The activity of DES9 is not due to the activity of each component separately or to the mixture of the two acids, but to the eutectic mixture of all of them. In the future, these solvents could improve the extraction, stability and bioavailability of bioactive compounds and the biorefinery of alperujo.

© 2020 Institution of Chemical Engineers. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The olive oil production industry generates huge amounts of alperujo or two olive oil extraction waste which has a great environmental impact because of its high phytotoxicity. In addition, the remarkable increase in production and the sensitivity of the population to environmental problems during recent years (Wiesman, 2009) have led to the adaptation and transformation of the traditional strategies of valorization. Currently, after drying and extracting the oil from the pomace, alperujo is destined to the cogeneration of electrical and thermal energy by means of combustion. Research has seen little success in finding a more environmentally and economically viable solution for general adoption so far. The potential uses of by-products from olive oil are related to health (cosmetics, pharmaceuticals, food additives, etc.), biofertilizers and/or compost, animal feed and with the production of alternative energy

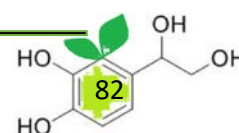
as a real biorefinery (biodiesel, gasification, methane production, etc.) (Serrano et al., 2017; Fernández-Bolaños et al., 1999).

The olive oil industry is changing in line with the new concept of quality, in which the most important focus is not only on the final product, but also its implication to both human and environmental health. In this way the by-products generated from the olive oil industry are being managed in order to obtain bioactive compounds and the total utilization of the rest of the components. The bioactive compounds, like phenols, and the monounsaturated fatty acids of the olive are responsible for the well-known beneficial effects of olive oil (Pérez-Jiménez et al., 2007). Approximately 98–99% of phenols remain in the alperujo after the extraction of olive oil (Sacchi et al., 2014). They are being widely studied for their biological activities such as antioxidants, antiplatelet, anti-inflammatory, antimicrobial, antiviral, anti-cancer, antihypertensive and cardioprotective (Benavente-García et al., 2000; Cicerale et al., 2012; Rozzi and Malpei, 1996).

Some of the most important commercial antioxidants found in olives and olive oil are hydroxytyrosol (HT), tyrosol (Ty), and oleuropein.

\* Corresponding author.

E-mail address: [guirogu@ig.csic.es](mailto:guirogu@ig.csic.es) (G. Rodríguez-Gutiérrez).  
<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.02.001>



Other important organic compounds that can be selectively recovered are lipids, water-soluble carbohydrates and proteins.

Therefore, waste treatment technologies which focus on the recovery of bioactive compounds from olive oil waste represent an interesting alternative that makes possible the biorefinery application for the utilization of this by-product. Recently a new alternative technology based on a thermal treatment with water steam at high pressure and temperature has been developed, tested on a pilot plant scale and already implemented at an industrial level, which achieves the separation of phases, making it possible to use its components (cellulose, hemicellulose, pectic substances and lignin) (Fernández-Bolaños et al., 1999, 2001). Bioactive compounds are also solubilized, making them easy to isolate and recover (Rodríguez et al., 2007a, b). Thus, the recovery of high value-added products such as hydroxytyrosol, 3,4-dihydroxyphenylglycol, mannitol, hemicellulosic polysaccharides, xylan type and oligosaccharides with functional properties became possible (Fernández-Bolaños et al., 2001, 2002, 2004). In addition, the thermal treatment produces a reduction in the solid phase with a high content of oil which is rich in minor components (Lama et al., 2011).

Another alternative to the extraction of components of interest is the use of conventional organic solvents. However, the use of large quantities has a negative effect on the environment, so during recent years other types of solvents have been sought, such as ionic solvents (IL) and deep eutectic solvents (DES).

Recently the effect of DES has been tested on olive oil, where its capacity for the extraction of phenolic compounds compared to the classical method of methanol/water extraction has been demonstrated (García et al., 2016). The use of these new solvents seems to be aimed at achieving not only an environmental improvement but technological as well, since it can be used in conjunction with other treatments to improve the results or even to reduce the energy requirements of the systems in which it is combined. This could be the case of the use of DES with treatments which are beginning to be used for a better management of by-products, such as thermal treatments.

Once it had been determined that the use of the DES increases the extraction of bioactive compounds in olive oil, and that the application of thermal treatments makes the industrial production of these compounds from by-products (alperujo) possible, the combination of the use of DES with thermal treatments should improve the extraction of bioactive components and make it possible to reduce the temperatures used, save energy and decrease the degradation of the components of interest.

For the first time, this work focuses on studying the combination of the use of eutectic solvents with thermal treatments, with the aim of lowering the temperature for the extraction of bioactive molecules from alperujo, making easier the further application of bioprocess for the total utilization of this by-product. A study was carried out on the behavior of different solvents at low temperatures with alperujo through solid-liquid separation, the extraction of total phenols, total sugars and uronic acids. After that, the most suitable solvents were chosen and studied at higher temperatures, through the same parameters plus the profile of individual phenols. Finally, it was verified that the positive effects were due to DES and not to its separate components.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples

The samples of fresh alperujo were taken at the middle of the 2016–2017 harvesting season, from the olive oil experimental mill at the Instituto de la Grasa (CSIC) (Seville, Spain). The alperujo (olive oil) came from olives of the Arbequina variety.

The samples were taken directly without pitting (45–50% of pit referred to as dry matter) at the end of the horizontal centrifuge of the two-phase extraction process. The samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  before extraction.

### 2.2. Chemicals

Trifluoroacetic acid (TFA) (CAS 76-05-1, purity 99%), anthrone (CAS 90-44-8, purity 97%) and Folin–Ciocalteu phenol were purchased from Sigma-Aldrich Química (Madrid, Spain).  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (CAS 497-19-8, purity  $\geq 99.5\%$ ) and methanol (CAS 67-56-1, purity  $\geq 99.9\%$ ) were from Panreac Química S.A. (Barcelona, Spain). A standard of gallic acid (GA) (CAS 149-91-7, purity  $\geq 97.5\%$ ) was purchased from Sigma-Aldrich Química. Acetonitrile (CAS 75-05-08, purity  $\geq 99.9\%$ ) was of HPLC-grade purity (Romyl, Teknokroma, Barcelona, Spain). The acetone (CAS 67-64-1, purity  $\geq 99.8\%$ ) was from Sharlau (Barcelo, Spain).

### 2.3. Preparation of eutectic solvents

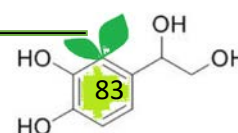
To synthesize eutectic solvents, the starting components were mixed according to the indications in Table 1. The mixtures corresponding to DES1, DES2, DES5, DES7, DES8, DES9 and DES10 were placed in round-bottomed flasks and heated in a water bath set at  $60^{\circ}\text{C}$  with stirring until the formation of a viscous, colorless and stable liquid. However, for those that contained sucrose in their compositions, DES3 and DES4, all the components were previously dissolved with water. To synthesize these solvents, the excess of water was eliminated in a rotatory evaporator under vacuum. Mixtures of choline chloride with sugars (sucrose and xylitol) and with 1,2-propanediol did not form a clear liquid when subjected to the same treatment as the rest of the DESs. In the sugar-based DES and 1,2-propanediol, distilled water was added to allow the solubilization of the components and thus favor the interaction of hydrogen bond donors and acceptors.

### 2.4. Colorimetric method of determination of total phenols

Total phenolic content was determined by the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method with some modifications (Obied et al., 2005). For all samples  $5\text{ }\mu\text{L}$  of sample were placed in a test tube and mixed with  $250\text{ }\mu\text{L}$  of Folin–Ciocalteu reagent and  $200\text{ }\mu\text{L}$  of a 20% sodium carbonate solution in water (weight/volume (w/v)). The mixture was stirred and allowed to react for 10 min and centrifuged to remove the pellet. The supernatant was used to measure the absorbance at 655 nm. The results were expressed as grams of gallic acid equivalents. A calibration curve was made with a set of known concentrations of a gallic acid standard.

### 2.5. Analysis of individual phenols

In order to identify the phenolic compounds, a high-performance liquid chromatography (Hewlett-Packard model 1100, Palo Alto, CA, USA) was used. This instrument was equipped with an array detector monitoring at 254, 280 and 340 nm wavelength and a C18 reverse-phase column (Spherisorb ODS-2;  $250 \times 4.6\text{ mm}$  i.d. and  $5\text{ }\mu\text{m}$  particle size) supplied by Teknokroma Tracer Extrasil OSD2 (Barcelona, Spain). The temperature of the column was kept constant at  $25^{\circ}\text{C}$  with a C18 guard column. All samples treated with hydrothermal treatments were filtered through  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  pore size filters and a volume of  $20\text{ }\mu\text{L}$  and each sample was injected into the HPLC instrument at a flow rate of  $1\text{ mL/min}$ . The analytical method was carried out using a linear gradient of two eluents: solvent A (Milli-Q water, pH 2.5 adjusted with 0.01% of trifluoroacetic acid) and solvent B (acetonitrile), using the following gradient



**Table 1 – Composition of the DES used in combination with thermal treatment to extract the alperujo sample (% of water is referred to the volume of all constituents).**

Component 1	Component 2	Component 3	% Water	Relation (w/v)	pH	Name
Choline chloride	Glycerol	–	–	1:2	6.3	DES1
Choline chloride	Xylitol	–	11	2:1:3	4.8	DES2
Choline chloride	Sucrose	–	25	1:1:9	4.6	DES3
Betaine	Sucrose	–	12.8	2:1:5	–	DES4
Choline chloride	Malonic acid	–	–	1:1	0.42	DES5
Betaine	Levulinic acid	–	–	1:2	0.40	DES6
Choline chloride	1,4-butanediol	–	–	1:5	6.1	DES7
Choline chloride	1,2-propanediol	–	7.5	1:1:1	5.1	DES8
Choline chloride	Glycolic acid	Oxalic acid	–	1:1.7:0.3	–	DES9
Choline chloride	Ethylene glycol	–	–	1:2	–	DES10

over a total run time of 55 min. 95% A and 5% B initially, 75% A and 25% B in 30 min, 50% A and 50% B in 45 min, 0% A and 100% B in 47 min, 75% A and 25% B in 95 min, and 95% A and 5% B in 52 min until completion of the run. Quantification was carried out by integration of the peaks at different wavelengths in function of the compounds, with reference to calibrations made using external standards.

## 2.6. Total sugars

The total content of neutral sugars was determined colorimetrically by the Antrona method (Dische, 1962) using a

spectrophotometer (BIO-RAD imark Microplate Reader, USA). An aliquot of the 100  $\mu$ L sample (in triplicate) was suitably diluted and 200  $\mu$ L of 0.2% (w/v) Antrone solution in concentrated sulfuric acid were added. The test tubes were shaken in a Vortex and heated for 5 min at 100 °C in a water bath. When the tubes were cooled in an ice bath, the absorbance at 630 nm was measured. Glucose was used as an external standard to prepare a calibration with aqueous solutions in a concentration range of 0.02–0.2 mg/mL.

## 2.7. Total uronic acids

The total content of uronic acids was quantified colorimetrically according to the chromogen method phenylphenol or *m*-hydroxybiphenyl with some modification (Blumenkrantz and Asboe-Hansen, 1973). The concentration of uronic acid is proportional to the pectin content with remarkable biological activities (Fernández-Bolaños et al., 2004). 200  $\mu$ L of sample were put in test tubes in triplicate and placed on an ice bath. They were mixed with 1.2 mL of 0.0125 M sodium tetraborate in concentrated sulfuric acid. Vortex tubes were shaken and heated at 100 °C for 5 min in a water bath. Once the tubes were cooled, 20  $\mu$ L of 0.15% *m*-hydroxybiphenyl in 0.5 % NaOH. A sensitive and specific reagent of the anhydrides of the uronic acids, were added. The color developed by vigorous agitation was measured at 520 nm in the microplate reader. Galacturonic acid was used as the external calibration standard. A calibration curve was prepared with the absorbance values of solutions of known concentration (from 0.02 to 0.2 mg/ mL).

## 2.8. Thermal treatments

All the experiments in this work have been done combining the use of DEs with heat treatments. Three types of tests were planned. In the first test, different DES were tested at low temperatures, up to 90 °C. A second test was carried out in which, two of the best DES, according to the results obtained,

were combined with thermal treatments up to 180 °C. Finally, a test was done at the optimum temperature to determine the effectiveness of DES against its components separately. The variables to be studied, apart from the DES were chosen according to previous studies carried out to extract bioactive compounds from olive oil by-products based on maximum solubilization of hydroxytyrosol and soluble sugars using the industrial thermal technologies (Fernández Bolaños et al., 2002, 2004, 2010):

Temperatures: 25 °C, 50 °C, 90 °C, 120 °C, 150 °C and 180 °C.

Time: two samples every 30 min for 2 h for temperatures

of 25 °C–90 °C; 60 min for 120 °C, 15 min for 150 °C and 5 min for 180 °C.

Solvent ratio: sample/solvent ratios (w/v): 1: 1 and 2: 1.

100 g of weed alperujo were used in duplicate plus the addition of water of DES for all the thermal treatments. After the treatments the samples were filtered through filter paper using a Buchner funnel for solid–liquid separation and the aqueous extract was recovered and stored at –20 °C until the analysis.

### 2.8.1. Treatments by indirect heating in oil or water bath (25 °C, 50 °C, 90 °C and 150 °C)

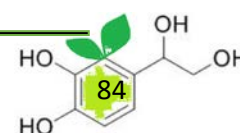
Thermostatic baths with water or oil PRECISBAT 6 rooms/Tanks 6,001,482 with a temperature control heater were used. The DES mixture with alperujo was introduced into glass vessels in the case of 25 °C, 50 °C and 90 °C and stainless steel bottles for the temperature of 150 °C. The agitation was carried out with rotary propeller agitators. In the case of treatments up to 90 °C, kinetics was performed for up to two hours every 30 min for the two studied relationships. In the case of the treatment at 150 °C, a time of 15 min was used for the previous experiment of the research group in the application of thermal pre-treatments for alperujo. All treatments up to 150 °C were carried out by indirect heating.

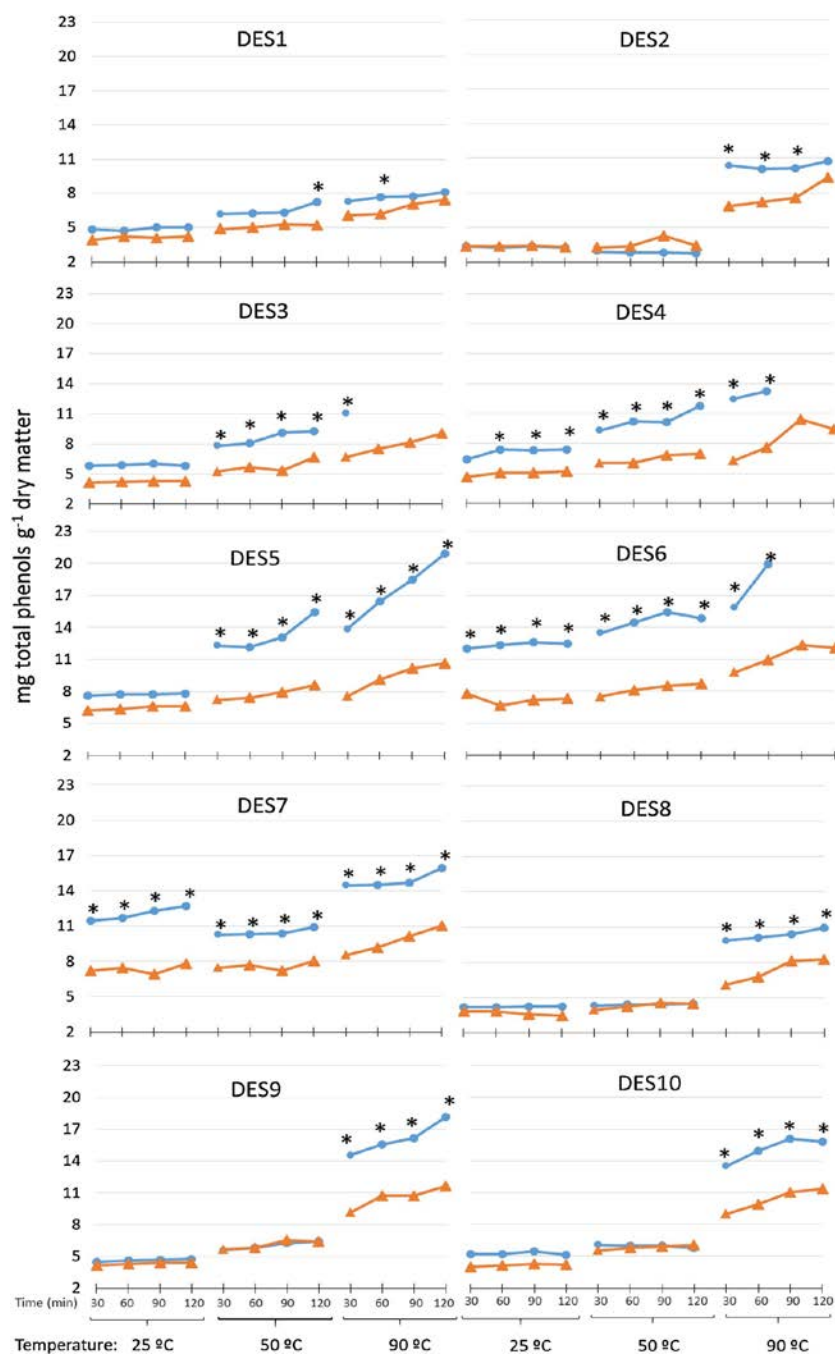
### 2.8.2. Autoclave treatments to 120 °C

DES mixtures and alperujo, together with the control were introduced into glass bottles numbered with the ratios 1:1 and 2:1 (w/v). They were placed in the autoclave for one hour at 120 °C. The samples were cooled and the phases were separated.

### 2.8.3. Thermal pre-treatment with steam at 180 °C

The hydrothermal treatment has been patented (Fernández-Bolaños et al., 2010) and was performed using a steam treatment reactor prototype that can operate at temperatures up to 190 °C and at a maximum pressure of 1.2 MPa. The heating of the alperujo was performed by the direct and indirect injection of steam. Only in this treatment an extra water was





**Fig. 1** – Colorimetric determination of total phenols by the Folin-Ciocalteu method of ten different DES (DES1 to DES10) at three temperatures (25, 50 and 90 °C) and four times (30, 60, 90 and 120 min) for the two ratios of Alperujo/DES studied (1:1 in circle and 2:1 in triangle). \*Significant differences ( $p < 0.05$ ).

added to the sample by the steam condensation in a relation sample/water of 1:5 (w/v) approximately. The use of direct steam in the steam explosion treatment can break the hydrogen bonds in the DES by the addition of extra water, unlike treatments with indirect heating. Therefore the effect of the addition of DES seems not to be due to the eutectic but to the components separately when the water addition is produced during the thermal treatment.

## 2.9. Statistical analysis

The results were expressed as mean values  $\pm$  standard deviations. STATGRAPHICS® plus software was used for statistical analyses. Comparisons amongst samples were made using one-way analysis of variance (ANOVA) with Student's t test and the LSD method at the same confidence level. A p value of  $< 0.05$  indicated statistically significant differences.

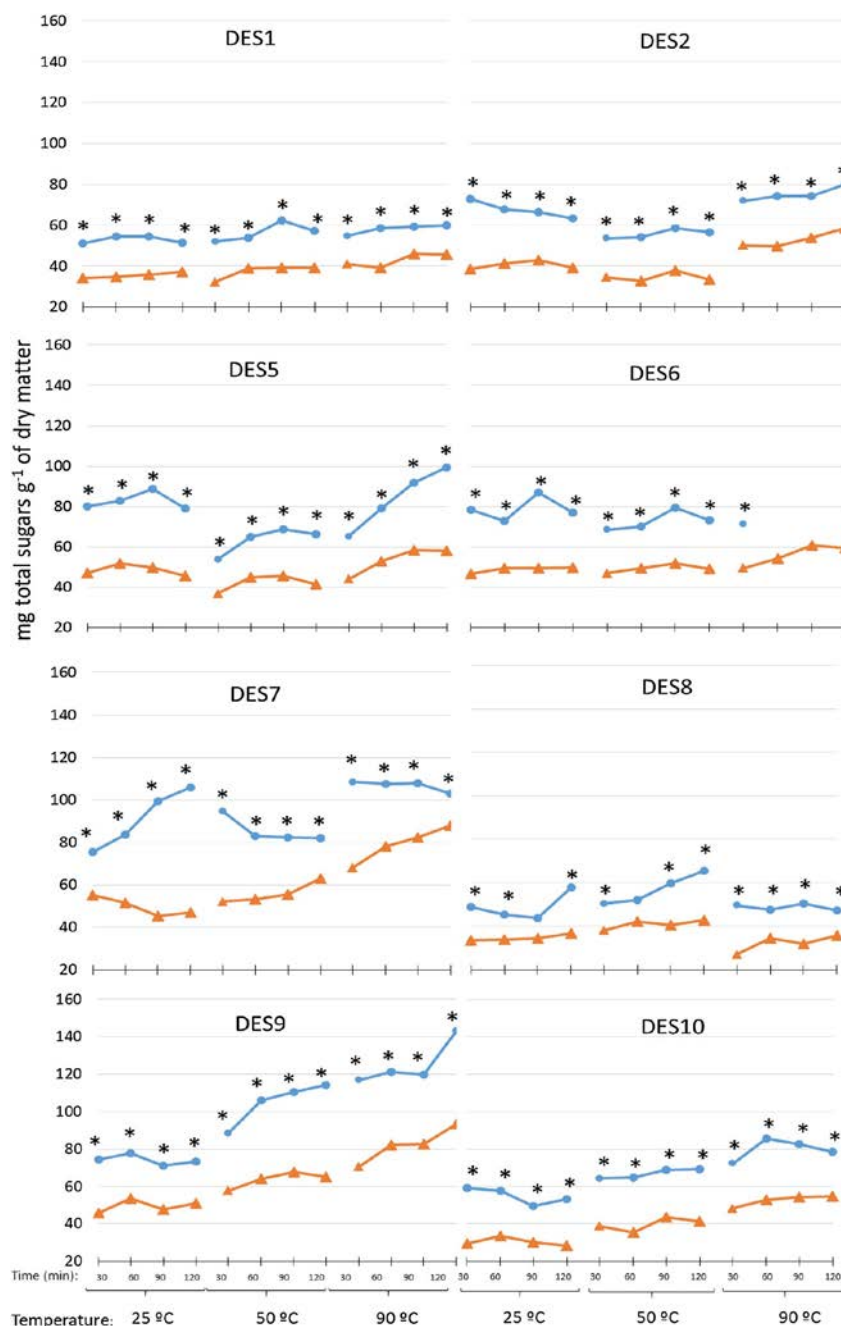


Fig. 2 - Colorimetric determination of total sugars by the Antrona method of eight different DES (DES1 to DES10) at three temperatures (25 °C, 50 °C and 90 °C) and four times (30, 60, 90 and 120 min) for the two ratios of Alperujo/DES studied (1:1 in circle and 2:1 in triangle). \*Significant differences ( $p < 0.05$ ).

### 3. Results and discussion

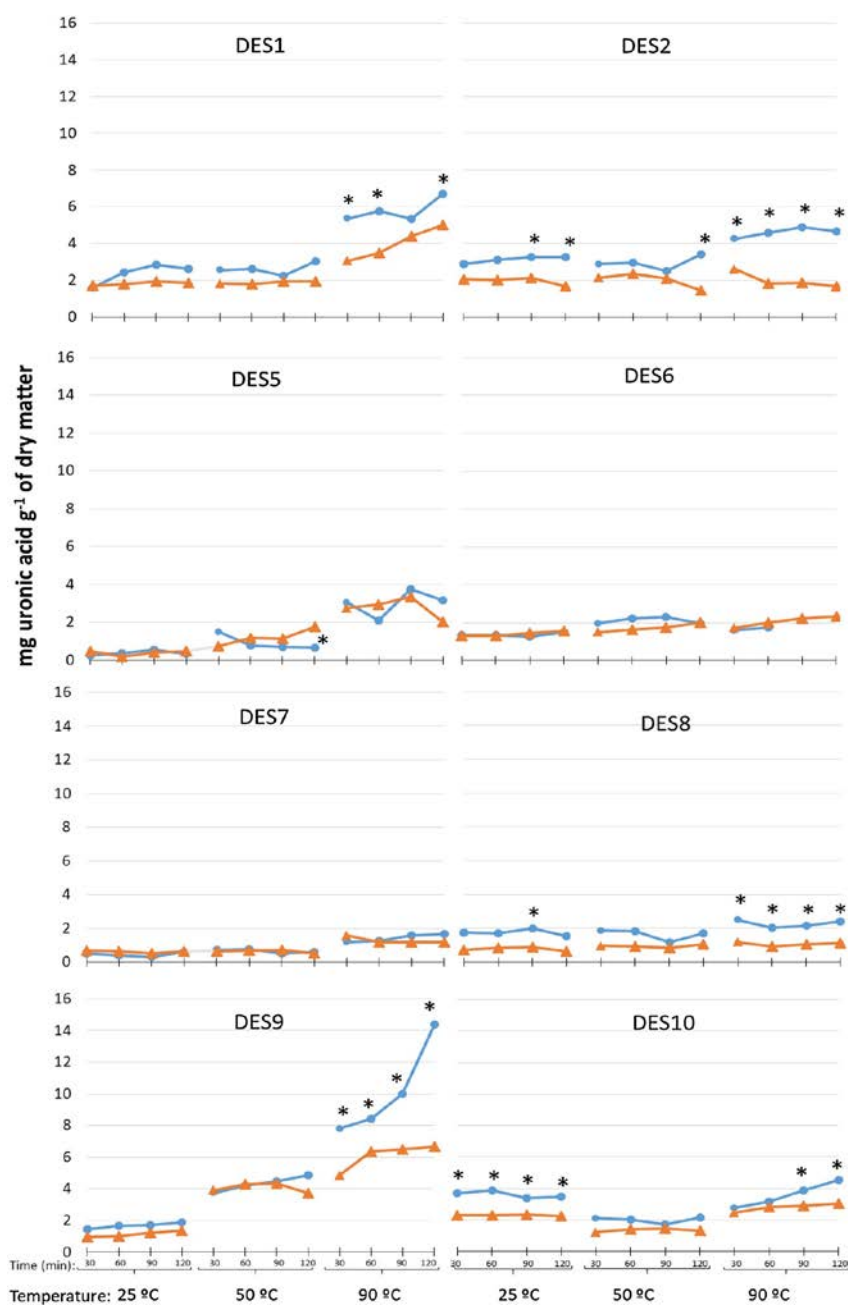
Different DES were tested in order to evaluate the best extraction of phenols and sugars at 25 °C, 50 °C and 90 °C (Figs. 1–3), using two ratios of alperujo:DES (1:1 and 2:1 (w/v)). The thermal stability of DES has been studied for different combinations, showing some authors (Wenjun et al., 2018) high range of degradation temperatures for the eutectic formed by choline chloride and sugars or alcohols (160 °C–260 °C and 119 °C–260 °C, respectively).

#### 3.1. Comparison of DES at lower temperatures

##### 3.1.1. Total phenols

The concentration of extracted total phenols is shown in Fig. 1 at different times (30, 60, 90, and 120 min) for the three chosen temperatures. In general, the concentration of extracted phenols increased for all DES with the time and the temperature. The quantification was not possible in some cases where the liquid-solid separation was not efficient. The best extractions of phenols were made in the range of 20 mg/g of dry mat-





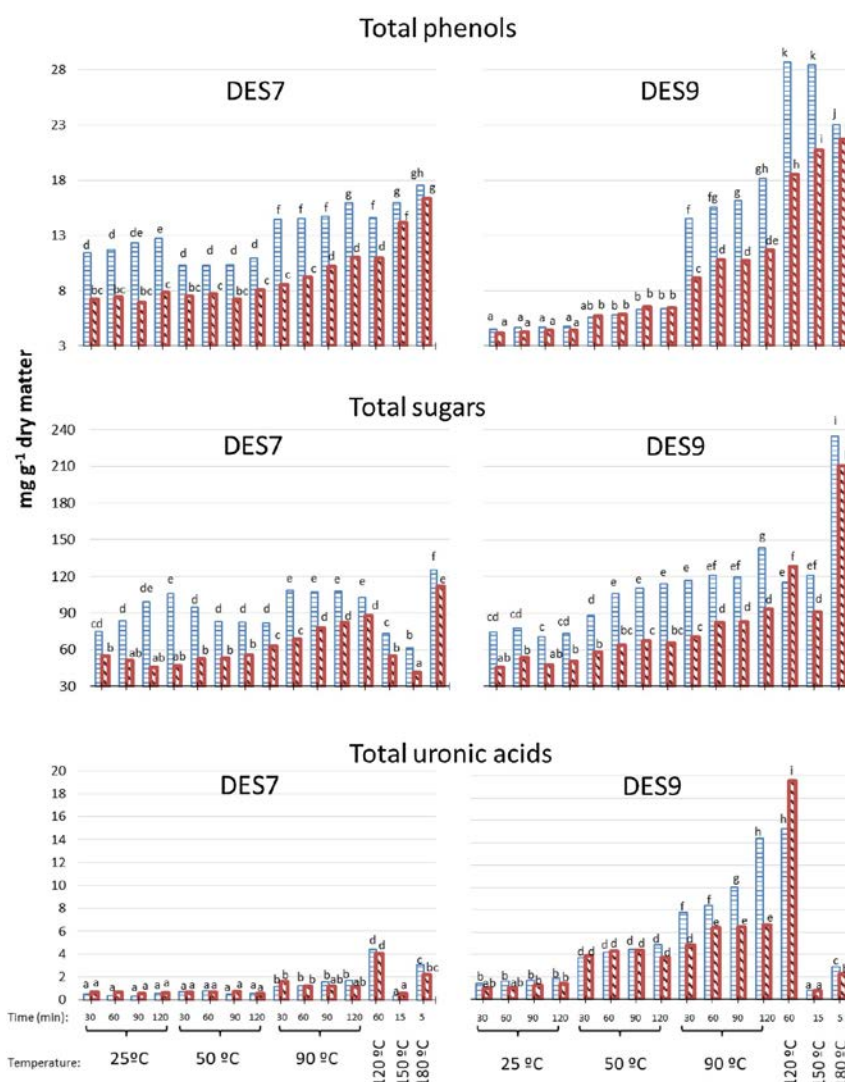
**Fig. 3 – Colorimetric determination of the uronic acid solubilization of eight DES at three temperatures (25, 50 and 90 °C) at four different times (30, 60, 90 and 120 min) using two alperujo:DES ratios (1:1 in circle and 2:1 in triangle). \*Significant differences ( $p < 0.05$ ).**

ter using DES5, DES6 and DES9, followed by DES7 and DES10 with 16 and 16.5 mg/g, and finally a group of DES with an average concentration of phenols between 11 and 13.5 mg/g, specifically solvents DES3, DES4 and DES8. The best extractions were made using the ratio of 1:1 for 90 °C in all solvents. The quantity of phenols extracted with DES4 and DES6 was high; although the difficult separation of the liquid and solid phase makes their industrial management more difficult.

The fact that great differences were seen between the results obtained from the eutectic solvents underlines the

importance of the composition of DES, making the appropriate design of this kind of green solvents crucial.

A hydro alcoholic extraction commonly used for phenols, such as metanol:water can extract about 2.17 mg/g of total phenol from dry alperujo. This quantity is increased when the alperujo is thermally treated up to 11.4 mg/g using the industrial condition of 160 °C for 60 min (Rubio-Senent et al., 2012). The values obtained using DES5 and DES9 at 90 °C are higher than those reported by these authors, who found that



**Fig. 4 – Total phenols, total sugars and total acid sugars extracted by DES7 and DES9 in all treatments using two alperujo:DES ratios (1:1 horizontal lines and 2:1 oblique lines). Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).**

their use could help to diminish the industrial temperature for extracting a higher amount of total phenols.

### 3.1.2. Total sugars

The total sugar concentrations are shown in Fig. 2 for all the DES used, except the solvents whose compositions included sugars in high proportions (DES3 and DES4), a fact that makes it impossible to determine the solubilized sugars.

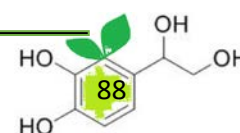
The best results for the solubilization of total sugars were achieved using DES7 and DES9 with values of 108.52 and 143.26 mg/g of dry matter at 90 °C, for the ratio 1:1, or 87.84 and 93.41 mg/g of dry matter at 90 °C for the ratio of 2:1, respectively. The best ratio found was 1/1, where the values for sugar were in some cases two times or even three times higher than the value obtained from the ratio 2/1.

The use of other solvents like DES1, DES6, DES8, DES5 and DES2 did not result in significant differences among the three temperatures; while the significant difference was only based

on the ratio alperujo:DES. The use of DES6 at 90 °C for 90 and 120 min did not allow for solid/liquid separation, making its utilization in combination with higher temperatures difficult.

The solubilization of sugars increased slightly using DES5 and DES10, and values close to 100 mg/g of dry matter at 90 °C were obtained.

The final values for sugars are the balance between solubilization and degradation. Thermal treatment enhanced the solubilization of the hemicellulose from the cell wall material, but also increased the degradation of sugars, thus obtaining hydroxymethylfurfural or furfural, in addition to other compounds. This balance depends on the severity of the treatment and the use or not of acid or bases (Rodríguez et al., 2007a). For the temperatures used, the degradation is very low, but the solubilization of sugar seems to be in the same range or even higher than the sugars extracted by Fernández-Bolaños et al. (2004) using an alcoholic extraction of alperujo obtained at three different times during the season (70–130 mg/g of dry alperujo).



**Table 2 – Individual phenolic compounds and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) concentration in mg/g of dry alperujo (3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG), hydroxytyrosol 4- $\beta$ -d-glucoside (Glu-HT), hydroxytyrosol (HT), tyrosol (Ty), verbascoside (Ve), vanillic acid (VA), vanillin (Va) and luteonin (Lu)) by HPLC-UV in the alperujo sample treated with water or with DES7 for the two relationship alperujo:DES. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ). Traces: concentration  $<0.1$  mg/L, nd: non detected.**

DES	Temp(°C)	Time (min)	Relation Alp:DES	DHPG	Glu-HT	HT	Ty	Va	Ve	HMF	VA	Lu
Control Water	–	–	–	0.001 a	0.006 a	0.002 a	Traces	0.01 a	Traces	nd	Traces	0.0008
DES7	120	60	1:1	0.62 e	0.50 d	1.33 h	0.18 b	0.38 c	0.15 b	nd	0.06 a	0.02 a
			2:1	0.56 de	0.36 c	1.30 h	0.21 b	0.28 c	0.16 bc	nd	0.06 a	0.01 a
		15	1:1	1.01 g	0.35 c	0.33 c	0.10 b	2.06 ij	nd	nd	0.05 a	0.03 a
			2:1	0.35 c	0.43 cd	1.96 i	0.39 cd	1.53 h	nd	3.75 c	0.01 a	0.02 a
		5	1:1	1.19 f	3.38 k	2.74 jk	0.28 c	6.73 l	0.27 e	nd	0.12 b	0.50 i
			2:1	1.23 gh	2.54 j	2.66 j	0.30 c	5.36 l	0.23 d	nd	0.11 b	0.32 fg
	150	30	1:1	0.20 bc	0.27 c	0.14 b	0.10 b	Traces	0.12 b	nd	0.04 a	0.22 d
			2:1	0.21 c	0.42 d	0.17 b	0.07 ab	Traces	0.10 ab	nd	0.05 a	0.34 g
		60	1:1	0.22 c	0.50 d	0.17 bc	0.09 ab	Traces	0.10 ab	nd	0.06 a	0.40 h
			2:1	0.21 c	0.38 c	0.12 b	0.08 ab	Traces	0.08 a	nd	0.05 a	0.36 gh
		90	1:1	0.16 bc	0.30 c	0.17 b	0.03 a	Traces	0.06 a	nd	0.03 a	0.13 b
			2:1	0.19 bc	0.40 cd	0.23 c	0.03 a	Traces	0.07 a	nd	0.03 a	0.18 c
	180	25	1:1	0.20 c	0.41 d	0.20 b	0.05 a	Traces	0.06 a	nd	0.03 a	0.19 cd
			2:1	0.20 bc	0.39 c	0.13 b	0.05 a	Traces	0.04 a	nd	0.03 a	0.19 cd
		30	1:1	0.26 c	0.43 d	0.35 c	0.13 b	Traces	0.15 bc	nd	0.06 a	0.55 ij
			2:1	0.26 c	0.41 d	0.30 c	0.14 b	Traces	0.13 b	nd	0.05 a	0.58 j
		60	1:1	0.25 c	0.41 d	0.35 c	0.19 b	Traces	0.18 c	nd	0.05 a	0.65 k
			2:1	0.24 c	0.39 c	0.29 c	0.15 b	Traces	0.13 b	nd	0.05 a	0.47 i
	25	50	1:1	0.22 bc	0.36 c	0.41 d	0.04 a	Traces	0.17 c	nd	0.04 a	0.33 g
			2:1	0.23 c	0.38 c	0.44 d	0.03 a	Traces	0.18 c	nd	0.04 a	0.35 gh
		90	1:1	0.22 c	0.36 c	0.38 cd	0.05 a	Traces	0.16 bc	nd	0.04 a	0.33 g
			2:1	0.26 c	0.47 d	0.59 de	0.01 a	Traces	0.21 d	nd	0.04 a	0.45 i
		120	1:1	0.53 d	0.43 d	0.37 c	0.26 c	Traces	0.14 b	nd	0.07 a	0.63 jk
			2:1	0.29 c	0.36 c	0.32 c	0.26 c	Traces	0.10 ab	nd	0.04 a	0.41 hi
	50	90	1:1	0.41 cd	0.40 c	0.51 d	0.47 d	Traces	0.16 bc	nd	0.06 a	0.69 k
			2:1	0.26 c	0.29 bc	0.32 c	0.27 c	Traces	0.09 ab	nd	0.03 a	0.32 fg
		120	1:1	0.31 c	0.33 c	0.33 c	0.05 a	Traces	0.11 b	nd	0.01 a	0.31 f
			2:1	0.40 cd	0.34 c	0.45 d	0.10 ab	Traces	0.16 bc	nd	0.01 a	0.42 hi
		180	1:1	0.33 c	0.34 c	0.37 c	0.08 a	Traces	0.11 b	nd	0.01 a	0.34 g
			2:1	0.42 d	0.34 c	0.50 d	0.15 b	Traces	0.15 bc	nd	0.01 a	0.35 g
	90	60	1:1	0.30 c	0.57 de	1.05 g	0.46 d	0.30 c	0.32 fg	nd	0.04 a	0.02 a
			2:1	0.37 c	0.51 d	0.88 f	0.34 c	0.28 c	0.24 de	nd	0.01 a	0.01 a
		15	1:1	0.30 c	0.41 d	1.51 hi	0.59 de	3.48 k	nd	2.13 b	0.01 a	0.02 a
			2:1	0.29 c	0.30 c	2.48 j	0.56 d	2.16 j	nd	4.65 d	Traces	0.01 a
		5	1:1	1.32 h	3.80 k	2.81 k	0.40 c	7.33 l	0.33 g	nd	0.13 b	0.53 j
			2:1	1.25 gh	2.62 j	2.70 k	0.44 d	6.07 l	0.23 de	nd	0.12 b	0.34 gh

### 3.1.3. Uronic acids

The analysis of uronic acid showed that the acid sugars were solubilized by the DES. The total uronic acid is shown in Fig. 3 for all samples except the DES that contain sugars (DES3 and DES4) because of the difficulty of the determination of initial sugars under these concentrations.

The best solvent for extracting uronic acid was by far DES9 where the concentration of 14.4 and 6.67 mg/g for the alperujo:DES ratios 1:1 and 2:1 were found, respectively. The acid sugar concentration increased with temperature and time, mainly at 90 °C, when there was a significant difference between the ratios of DES used.

The values obtained for DES1 did not change for 25 °C or 50 °C, increasing significantly at 90 °C, when the values found for the two ratios were also significantly different, reaching maximums of 6.69 and 4.99 mg/g for the ratios 2:1 and 1:1, respectively. DES2 showed a similar behavior, where the highest solubilization of uronic acids was at 90 °C using the 1:1 ratio (4.86 mg/g). For DES5 the concentration of acid sugars increased with the temperature and the ratio alperujo:DES, obtaining the highest values at 90 °C for the ratios 1:1 and 2:1 of 3.75 and 3.32 mg/g, respectively.

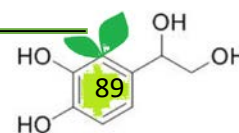
There were no differences in the uronic concentration among the three temperatures using DES6, DES7, DES8 and DES10, neither for the two alperujo:DES ratios in the cases of (DES6 and DES7).

Remarkable values were found using DES9, which were even three times higher than those reported by other authors using conditions like 5 mg/g at 160 °C for 30 min without DES (Rubio-Senent et al., 2015).

### 3.2. Study of selected DES at higher temperatures

#### 3.2.1. Total phenols and sugars

Based on the comparison of the solubilization of phenols, total sugars and total uronic acid, the solvents DES7 and DES9 were chosen to be combined with the thermal treatments at higher temperatures. The conditions were 120 °C, 150 °C and 180 °C for 60, 15 and 5 min, respectively, with the two last conditions being real alternatives for the utilization of alperujo in the industry. DES9 is an acid solvent that showed the best solubilization of sugars, and one of the best for phenol extraction. DES7 is an alcoholic solvent which showed a promising solubilization of total sugars and phenols.





**Table 3 – Individual phenolic compounds and 5-hydroxymethylfurfural (HMF) concentration in mg/g of dry alperujo (3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG), hydroxytyrosol 4- $\beta$ -D-glucoside (Glu-HT), hydroxytyrosol (HT), tyrosol (Ty), verbascoside (Ve), vanillic acid (VA), vanillin (Va) and luteonin (Lu)) by HPLC-UV in the alperujo sample treated with water or with DES9 for the two relationship alperujo:DES. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).**

DES	Temp(°C)	Time (min)	Relation Alp:DES	DHPG	Glu-HT	HT	Ty	Va	Ve	HMF	VA	Lu
DES9	30	30	1:1	0.20 c	0.58 d	0.77 e	nd	1.68 i	0.27 ef	nd	0.07 a	0.48 i
		60	1:1	0.51 d	0.73 e	1.37h	nd	0.84 f	0.20 dc	nd	0.10 b	0.29 f
		90	1:1	0.54 d	0.74 e	1.48 hi	0.08 a	0.86 f	0.26 e	nd	0.11 b	0.31 fg
		120	1:1	0.56 d	0.74 e	1.50 i	0.10 ab	0.91 fg	0.21 d	nd	0.11 b	0.32 fg
	25	30	2:1	0.31 c	0.15 b	1.74 i	0.17 b	0.91 fg	0.23 de	nd	0.07 a	0.22 d
		60	2:1	0.33 c	0.45 d	0.97 g	0.08 a	0.55 d	0.02 a	nd	0.07 a	0.13 b
		90	2:1	0.38 c	0.46 d	1.01 g	0.09 a	0.56 d	0.14 b	nd	0.07 a	0.14 b
		120	2:1	0.39 c	0.45 d	0.98 g	0.08 a	0.56 d	0.14 b	nd	0.06 a	0.13 b
	50	30	1:1	0.71 e	0.69 e	0.70 e	0.02 a	0.74 e	0.08 a	nd	0.08 a	0.35 gh
		60	1:1	0.54 d	0.64 e	0.59 d	0.01 a	0.61 de	0.08 a	nd	0.07 a	0.28 ef
		90	1:1	0.69 e	0.65 e	0.73 e	0.08 a	0.63 de	0.10 ab	nd	0.08 ab	0.32 fg
		120	1:1	0.84 ef	0.73 e	0.98 g	0.21 bc	0.71 e	0.12 b	0.33 a	0.10 b	0.44 i
	90	30	2:1	0.45 d	0.40 cd	0.95 g	0.07 a	0.65 e	0.13 b	nd	0.06 a	0.18 c
		60	2:1	0.58 d	0.42 d	1.19 gh	0.12 ab	0.75 e	0.12 b	nd	0.06 a	0.23 de
		90	2:1	0.41 cd	0.40 cd	0.91 g	0.07 a	0.57 de	0.11 ab	nd	0.05 a	0.17 c
		120	2:1	0.45 d	0.39 c	1.01 g	0.09 a	0.57 d	0.14 b	nd	0.05 a	0.16 bc
	120	30	1:1	0.53 d	0.84 f	1.95 ij	0.37 c	nd	0.31 fg	2.1 b	0.11 b	0.42 hi
		60	1:1	0.37 c	0.86 f	2.17 j	0.60 e	nd	0.23 de	10.50 e	0.12 b	0.42 hi
		90	1:1	0.42 cd	0.90 f	2.95 k	0.93 fg	nd	0.17 c	27.34 g	0.16 c	0.47 i
		120	1:1	0.36 c	0.58 de	2.30 j	0.77 e	nd	0.07 a	26.41 fg	0.12 b	0.31 fg
	150	30	2:1	0.47 d	0.53 d	1.28 h	0.14 b	0.62 e	0.20 cd	nd	0.06 a	0.21 d
		60	2:1	0.49 d	0.53 d	1.43 h	0.25 c	0.50 d	0.26 e	nd	0.06 a	0.22 d
		90	2:1	0.49 d	0.58 d	1.80 i	0.42 d	0.51 d	0.29 f	1.50 ab	0.08 a	0.27 ef
		120	2:1	0.36 c	0.47 d	1.43 h	0.36 c	0.41 cd	0.20 d	1.96 ab	0.06 a	0.20 cd
	180	30	1:1	0.52 d	0.30 c	26.61 n	2.01 i	0.52 d	0.23 d	29.74 g	0.16 c	0.17 c
		60	2:1	0.80 ef	0.24 bc	10.24 l	1.46 h	0.75 e	0.24 de	23.86 fg	0.09 a	0.13 b
	150	30	1:1	0.45 d	0.49 d	85.81 q	2.28 j	6.65 kl	nd	93.90 j	0.02 a	0.10 ab
		60	2:1	0.41 cd	0.34 c	61.93 p	1.60 hi	4.85 k	nd	77.53 ij	0.01 a	0.08 a
	180	30	1:1	1.42 h	nd	28.26 n	2.27 ij	nd	nd	47.26 h	0.17 c	0.56 j
		60	2:1	1.36 h	nd	18.49 m	2.37 j	nd	nd	41.71 h	0.17 c	0.43 i

Traces: concentration <0.1 mg/L, nd: non detected.

After the thermal treatments, each liquid phase was analyzed to determine the total and individual phenols, the total sugars and the total uronic acid (Fig. 4). The extraction of total phenols at temperatures lower than 120 °C was higher using DES7. At higher temperatures, the use of DES9 led to extract values for total phenols of 28.69 mg/g at 120 °C at a ratio of 1:1, and 21.67 mg/g at 180 °C and a ratio 2:1. The maximum values obtained with DES7 were 17.51 mg/g and 16.31 mg/g at 180 °C and ratios of 1:1 and 2:1, respectively. The use of higher temperatures helps DES extract phenols. The most important finding was the high solubilization achieved at 120 °C was higher than that obtained at 180 °C, meaning the use of DES helps to reduce the temperature to extract a similar or even larger amount of these bioactive compounds. The industrial solubilization of total phenols has been quantified at 11.40 mg/g as mentioned above, which is less than half the values obtained in the present work for DES9 at 120 °C.

With regard to the solubilization of total sugars the use of DES7 increased the concentration up to 120 °C, falling after 120 °C and finally increasing at 180 °C, when the maximum was obtained (125.17 mg/g and 111.72 mg/g for the ratios 1:1 and 2:1, respectively). The behavior of DES9 was different, although the maximum was also found at 180 °C (234.67 mg/g and 210.45 mg/g for the ratios 1:1 and 2:1, respectively). In general, the extraction of sugars was higher using DES9. These values are higher than those reported by other authors at the same thermal condition at 180 °C without DES, with 130 mg/g for untreated alperujo, and 141 mg/g for alperujo treated at 180 °C (Fernández-Bolaños et al., 2004). Besides the degrada-

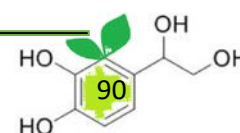
tion of sugar increase with temperature, the maximum was obtained at the highest temperature because the reaction time was lower in comparison with the other treatments at lower temperatures. Thus, the use of DES improved significantly the solubilization of total sugars from the hemicellulosic composition present in the cell wall in combination with the thermal treatment.

The uronic acid extraction was also significantly higher using the solvent DES9. In both solvents the concentration of acid sugars increased with the temperature up to 120 °C, obtaining a maximum for DES7 of 4.42 and 4.06 mg/g, and for DES9 of 15.21 mg/g and 19.52 mg/g for the ratios 1:1 and 2:1, respectively. These values are also higher than the concentration of acid sugars reported by other authors, without both DES and thermal treatment, of 5.4 mg/g (Rubio-Senent et al., 2015).

The best values at higher temperatures were obtained using DES9, and 120 °C was the temperature which produced the highest extraction of phenols and acid sugar with minimal differences between ratios 1:1 or 1:2.

### 3.2.2. Individual phenols

The composition of individual phenols was shown and the use of water with DES7 (Table 2) and DES9 (Table 3) as extracting agents in combination with thermal treatments was compared. The control was measured as a methanolic extraction of the alperujo without thermal treatment. The DHPG concentration increased with temperature. In the case of DES7, the DHPG remained constant between 25 °C and 50 °C, increasing at 90



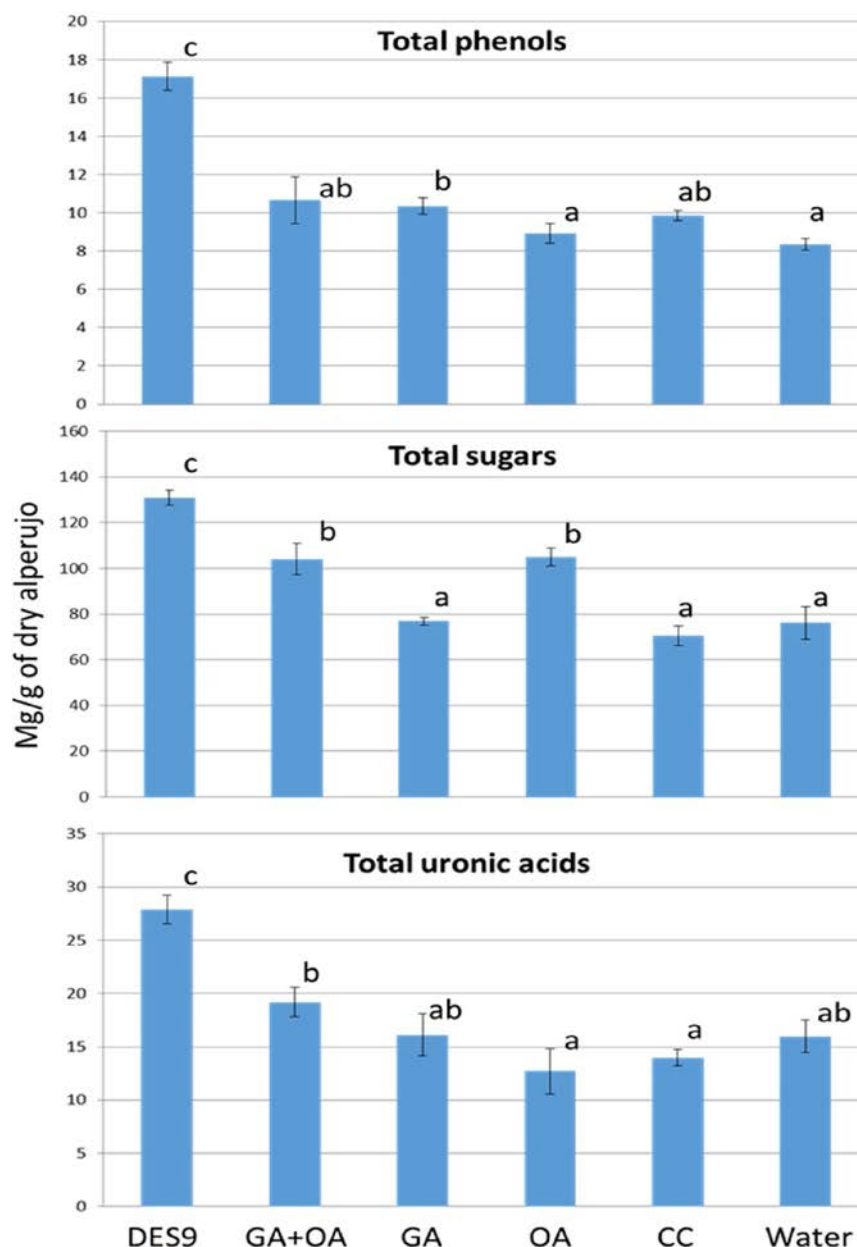


Fig. 5 – Total phenols, total sugars and total acid sugars extracted by DES9, its components (glycolic acid (GA), oxalic acid (OA) and choline chloride (CC)), the mixture of the two acids (GA + OA) and water at 120 °C in the ratio of 1:1 (DES or component:alperujo). Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

°C and at 180 °C, obtaining similar values than those obtained with water. The best solubilization of DHPG was achieved using DES9 at 180 °C, to obtain 1.42 mg/g, which is higher than the control or the value obtained with DES7 (1.23 and 1.31 mg/g, respectively). The use of DES9 led to an increase in the concentration of DHPG (1.42 mg/g) at 180 °C over the values obtained with water and DES7. The concentration of HT was similar when water and DES7 were used; and the extraction with DES9 was remarkable, where the maximum values were achieved at 150 °C (85.81 and 61.93 mg/g for 1:1 and 1:2 relationships, respectively). The acidic nature of DES9 enhanced the hydrolysis of HT precursors, thus increasing the final concentration of this phenol significantly. The high concentration

of HMF indicated the degradation of sugars at higher temperatures. The increment in vanillin and vanillic acid at 180 °C with water as a degradation product of ligning (Brebú and Vasile, 2010) also indicated the severe increase when the DES was used because this increment was higher at 150 °C with DES than with water.

The extraction of tyrosol was very similar to the HT extraction; while the rest of the quantified phenols presented other kinds of behavior. In this way, the vanillin increased with the temperature in the case of DES7 at 120 °C over the values found using water. The use of DES9 decreased the concentration of vanillin with the temperature and the time. The maximum concentration of acid vanillic was achieved using DES9, fol-

lowing by DES7 and finally with water at 180 °C. The extraction of luteonin and its glucoside was higher using DES7.

In general, DES9 was the best for the extraction of total phenols from alperujo, obtaining 28.69 mg/g at 120 °C for the ratio of 1:1. This value was higher than the concentration of phenol raising by water or with any solvent at higher temperatures. The use of water solubilized 13.05 and 11.87 mg/g at 120 °C and 60 min for the ratios 1:1 and 1:2, respectively, or 17.08 and 16.19 mg/g at 180 °C and 60 min for the ratios 1:1 and 1:2, respectively. In the bibliography values of 5.4 mg/g for 15 min or 11.43 mg/g for 75 min, both at the same thermal condition at 160 °C without DES, were found (Rubio-Senent et al., 2012). On the other hand, the sum of all the individual phenols quantified using DES9 at 150 °C (189.8 and 146.8 mg/g for the ratios 1:1 and 1:2, respectively) and 180 °C (80.2 and 64.7 mg/g for the ratios 1:1 and 1:2, respectively) are higher and exceeded the values obtained calorimetrically as total phenols. This fact could be due to the presence of interferences that do not allow for accurate quantification by the Folin method (Rubio-Senent et al., 2012).

It is important to mention that the addition of water during the treatment at 180 °C should broke the hydrogen bonds of DES. Thus, it seems the effect must be due to individual components or their mixture but not due to the formation of DES.

### 3.3. Test for the individual components of the DES

The possible changes in properties of DES at high temperatures was evaluated by other authors, showing the DES formed by choline chloride with glycolic acid or oxalic acid a degradation temperature of 226 °C and 159 °C, respectively (Florindo et al., 2014). It is expected the use of oxalic and glycolic acids to form DES9 has a higher degradation temperature than the lower one, the oxalic acid. Other authors also showed the use of oxalic acid in DES should be at temperatures lower than the onset temperature of 134 °C in which a degradation compounds start to be produced (Haz et al., 2016). To evaluate the possible changes in properties of DES9 at 120 °C using indirect heating and to establish that the effects are due to the formation of the eutectic, but not its individual constituents, the following test was carried out. A temperature of 120 °C was chosen and the concentrations of total sugars, phenols and uronic acid were measured. Each component (glycolic acid, oxalic acid and choline chloride), and the mixture of the two acids (glycolic and oxalic acids) were solved in water and added to the alperujo sample in the ratio of 1:1 (w/v). The results are shown in Fig. 5, where the effect of the extraction of the constituents of DES9 (choline, glycolic acid and oxalic acid) was compared with the eutectic and with the effect of the mixture of the two acids.

The extraction of total phenols showed that the maximum concentration was obtained with the eutectic while there were no significant differences between each component and the mixture of the two acids, with the smallest extraction being carried out with water.

The extraction of total sugars also showed the best result for the eutectic, followed by the mixture of the acids and the oxalic acid, obtaining the lowest concentration when the rest of the components were used.

In the case of the uronic acid, the best result was obtained once again with the eutectic followed by the mixture of the two acids, being no significant differences in the concentration obtained using the rest of the components.

Thus, the effectiveness of the eutectic is due to the formation of these solvents but not for the individual components when the thermal treatments were carried out by indirect heating.

## 4. Conclusion

The best results for the extraction of phenols and sugars were achieved by DES9 formed by choline, glycolic acid and oxalic acid. The use of DES9 allows for the same or even a better solubilization of total sugars and total phenols at 120 °C than the treatment at 180 °C, increasing the concentration of acid sugars by six times and the concentration of hydroxytyrosol by 30 times. In this way the use of this kind of green solvent allows to reduce the temperature in the thermal treatments that are used industrially nowadays for the valorization of alperujo. The activity of DES9 is not due to the activity of each component separately, nor to the mixture of the two acids, but to the eutectic mixture of all of them for the indirect heating treatments. The future of these solvent should be focused on the use of components obtained from by-products to also treat by-products. Further studies will be necessary to assess the application of DES to improve the extraction of other thermosensitive phenols, or to be used directly as a carrier of the bioactive compounds solubilized, improving, besides others, their own bioavailability. In the same way, further analysis to determine the possible thermal degradation and the final structure of the DES will be necessary.

### Declaration of interests

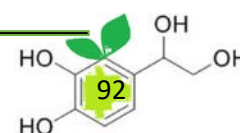
The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Acknowledgements

This research was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and co-funded by a European Social Fund (ESF) (project AGL2016-79088R), the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness Ramon y Cajal Programme: (RyC 2012-10456) and University of Córdoba.

## References

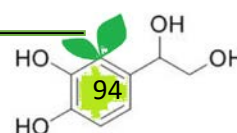
- Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuño, A., Del Río, J.A., 2000. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. Leaves. *Food Chem.* 68, 457–462, [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00221-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00221-6).
- Blumenkrantz, N., Asboe-Hansen, G., 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* 54, 484–489, [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90377-1](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(73)90377-1).
- Brebu, M., Vasile, C., 2010. Thermal degradation of lignin - a review. *Cell. Chem. Technol.* 44, 353–363.
- Cicerale, S., Lucas, L.J., Keast, R.S.J., 2012. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23 (2), 129–135, <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.09.006>.
- Dische, Z., 1962. Color Reactions of Carbohydrates. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, pp. 477–512.
- Fernández Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillén, R., Jiménez, A., 2002. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or “alperujo”. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6804–6811, <http://dx.doi.org/10.1021/jf011712r>.
- Fernández-Bolaños, J., Felizón, B., Heredia, A., Guillén, R., Jiménez, A., 1999. Characterization of the lignin obtained by alkaline delignification and of the cellulose residue from



- steam-exploded olive stones. *Bioresour. Technol.* 68, 121–132, [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00134-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00134-5).
- Fernández-Bolaños, J., Felizón, B., Heredia, A., Rodríguez, R., Guillén, R., Jiménez, A., 2001. Steam-explosion of olive stones: hemicellulose solubilization and enhancement of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioresour. Technol.* 79, 53–61, [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00015-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00015-3).
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Gómez, E., Guillén, R., Jiménez, A., Heredia, A., Rodríguez, R., 2004. Total recovery of the waste of two-phase olive oil processing: insolation of added-value compounds. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5849–5855, <http://dx.doi.org/10.1021/jf030821y>.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Lama, A., Sanchez, P., 2010. *Dispositivo y Procedimiento Para el Tratamiento de los Subproductos de la Obtención de Aceite de Oliva. Oficina Española de Patentes y Marcas*, pp. P201031236.
- Florindo, C., Oliveira, F.S., Rebelo, L.P.N., Fernandes, A.M., Marrucho, I.M., 2014. Insights into the synthesis and properties of deep eutectic solvents based on cholinium chloride and carboxylic acids. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2, 2416–2425, <http://dx.doi.org/10.1021/sc500439w>.
- García, A., Rodríguez Juan, E., Rodríguez-Gutiérrez, G., Julian Rios, J., Fernández-Bolaños, J., 2016. Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvent (DES). *Food Chem.* 197, 554–561, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.076>.
- Haz, A., Strižincová, P., Majová, V., Skulcova, A., Jablonsky, M., 2016. Thermal stability of selected deep eutectic solvents. *Int. J. Sci. Res.* 7, 14441–14444.
- Lama, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rubio-Senet, F., Gómez-Carretero, A., Fernández-Bolaños, J., 2011. A new hydrothermal treatment of alperujo enhances the content on bioactive minor components in crude pomace olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 59, 1115–1123, <http://dx.doi.org/10.1021/jf103555h>.
- Obied, H.K., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K., Stockmann, R., 2005. Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *J. Agric. Food Chem.* 53, 823–837, <http://dx.doi.org/10.1021/jf048569x>.
- Pérez-Jiménez, F., Ruano, J., Pérez-Martínez, P., López-Segura, F., López-Miranda, J., 2007. The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 1199–1208, <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.200600273>.
- Rodríguez, G., Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, R., Guillén, R.A., Jiménez, A., 2007a. Effect of steam treatment of alperujo on the composition, enzymatic saccharification and in vitro digestibility of alperujo. *J. Agric. Food Chem.* 55, 136–142, <http://dx.doi.org/10.1021/jf0616513>.
- Rodríguez, G., Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, R., Guillén, R.A., Jiménez, A., 2007b. Antioxidant activity of effluents during the purification of hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol from olive oil waste. *Eur. Food Res. Technol.* 224, 733–741 <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00217-006-0366-1>.
- Rozzi, A., Malpei, F., 1996. Treatment and disposal of olive mill effluents. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 135–144, [http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305\(96\)00042-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0964-8305(96)00042-X).
- Rubio-Senet, F., Rodríguez-Gutiérrez, G., Lama-Muñoz, A., Fernández-Bolaños, J., 2012. New phenolic compounds hydrothermally extracted from the olive oil byproduct alperujo and their antioxidative activities. *J. Agric. Food Chem.* 60, 1175–1186, <http://dx.doi.org/10.1021/jf204223w>.
- Rubio-Senet, F., Rodríguez-Gutiérrez, G., Lama-Muñoz, A., Fernández-Bolaños, J., 2015. Pectin extracted from thermally treated olive oil by-products: characterization, physico-chemical properties, in vitro bile acid and glucose binding. *Food Hydrocoll.* 43, 311–321, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.06.001>.
- Sacchi, R., Paduano, A., Savarese, M., Vitaglione, P., Fogliano, V., 2014. Extra virgin olive oil: from composition to “Molecular Gastronomy”. *Cancer Treat. Res.* 159, 325–338 [https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-38007-5\\_19](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-38007-5_19).
- Serrano, A., Feroso, F.G., Alonso-Fariñas, B., Rodríguez-Gutiérrez, G., Fernandez-Bolaños, J., Borja, R., 2017. Olive mill solid waste biorefinery: high-temperature thermal pre-treatment for phenol recovery and biomethanization. *J. Clean. Prod.* 148, 314–323, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.01.152>.
- Wenjun, C., Zhimin, X., Jinfang, W., Jingyun, J., Xinhui, Z., Tiancheng, M., 2018. Investigation on the thermal stability of deep eutectic solvents. *Acta Phys. -Chim. Sin.* 34, 904–911, <http://dx.doi.org/10.3866/PKU.WHXB201712281>.
- Wiesman, Z., 2009. Non-conventional Olive Oil Industries: Products and Biotechnologies. *Desert Olive Oil Cultivation. Advanced Biotechnologies*, 303–327. Ed. Academic Press, Oxford, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374257-5.00012-9>.

# Capítulo III

Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of  
Hydroxytyrosol and 3,4-Dihydroxyphenylglycol  
Purified from Table Olive Effluents.

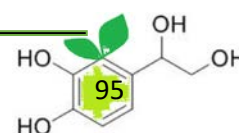


## Resumen Capítulo III

Las actividades biológicas de los componentes bioactivos presentes en la aceituna, tanto en el fruto como en los subproductos que de ella se obtienen son ampliamente conocidas. De todas ellas, la más estudiada es la capacidad antioxidante asociadas directamente a fenoles como la oleuropeína, el verbascósido, hidroxitirosol y al no tan estudiado 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG). El DHFG es un fenol simple con la misma estructura orto-difenólica que el HT, pero con un grupo hidroxilo adicional en posición  $\beta$ , que presenta una alta capacidad antioxidante y un elevado potencial antiinflamatorio.

El DHFG ha sido detectado recientemente en subproductos de la industria del olivo tales como el alperujo, aunque en muy bajas concentraciones debido principalmente a los tratamientos térmicos requeridos para la solubilización de los fenoles en la fase líquida. Además, su extracción y purificación no es sencilla.

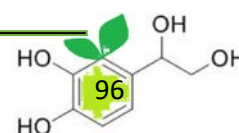
En el presente trabajo se estudiaron distintas variedades de aceitunas, en dos estados de madurez, conservadas en tres tipos de líquidos (salmuera, salmuera con ácido acético y agua acidificada), ya que previamente había sido identificada en las salmueras de conservación de las aceitunas negras al natural, sin tratamiento con sosa. Los nuevos efluentes líquidos basados en el uso del ácido acético en la industria de las aceitunas de mesa facilitan la extracción de HT y de DHFG, y por tanto, el posterior uso de estos líquidos como fuente de dichos fenoles. Este trabajo tiene dos objetivos: (1) medir la solubilización de los compuestos fenólicos durante dos años utilizando más de treinta variedades de aceitunas con diferente índice de madurez como fuente potencial de HT y DHFG, y (2) evaluar la actividad antiinflamatoria de los compuestos fenólicos purificados. Los resultados mostraron que los tres tipos de efluentes de conservación pueden ser usados para la obtención de los dos compuestos fenólicos, ya que presentaron



altas concentraciones en la mayoría de las variedades independientemente del estado de madurez. Para la extracción de HT y DHPG se utilizaron los efluentes de las variedades con mayor concentración de fenoles de HT y DHPG. Se evaluó la actividad antioxidante y antiinflamatoria in vitro del DHFG junto a la del HT mediante la determinación de citoquinas proinflamatorias como el Factor de Necrosis Tumoral Humano (TNF) Interleucina-6 (IL-6) e Interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) en macrófagos derivados de la línea celular THP-1. Ambos fenoles mostraron una importante actividad antiinflamatoria al someter a los macrófagos a LPS generando un estado inflamatorio que altera el equilibrio intracelular. Se estudió la expresión de las citoquinas por qPCR (quantitative polymerase chain reaction) y los niveles de estas proteínas mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Debido a los numerosos compuestos antioxidantes presentes en la aceituna y sus efluentes, y teniendo presente que en los procesos inflamatorios está implicado el estrés oxidativo, estos compuestos antioxidantes podrían presentar numerosos efectos beneficiosos en enfermedades inflamatorias.

Por lo tanto, se demostró que los efluentes que se generan en la industria de aderezo para la conservación de aceitunas sin tratamiento con sosa son una buena fuente tanto de DHFG como de HT, y que los extractos obtenidos de dichos fenoles tienen una importante actividad antioxidante y antiinflamatoria.





## Article

# Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol and 3,4-Dihydroxyphenylglycol Purified from Table Olive Effluents

África Fernández-Prior <sup>1</sup>, Alejandra Bermúdez-Oria <sup>1</sup>, María del Carmen Millán-Linares <sup>1</sup>, Juan Fernández-Bolaños <sup>1</sup>, Juan Antonio Espejo-Calvo <sup>2</sup> and Guillermo Rodríguez-Gutiérrez <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de la Grasa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Campus Universitario Pablo de Olavide, Edificio 46, Ctra. de Utrera, km. 1, 41013 Seville, Spain; mafprior@ig.csic.es (Á.F.-P.); aleberori@ig.csic.es (A.B.-O.); mcmillan@ig.csic.es (M.d.C.M.-L.); jfbg@csic.es (J.F.-B.)

<sup>2</sup> Tecnofood ID Soluciones S.L. C/Paz nº 4, 3º G, 18.360 Huétor Tájar, 18016 Granada, Spain; jaespejo@hotmail.com

\* Correspondence: guirogu@ig.csic.es; Tel.: +34-954-611-550; Fax: +34-954-616-790



**Citation:** Fernández-Prior, Á.; Bermúdez-Oria, A.; Millán-Linares, M.d.C.; Fernández-Bolaños, J.; Espejo-Calvo, J.A.; Rodríguez-Gutiérrez, G. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol and 3,4-Dihydroxyphenylglycol Purified from Table Olive Effluents. *Foods* **2021**, *10*, 227. <https://doi.org/10.3390/foods10020227>

**Academic Editors:**  
Ruth Hornedo-Ortega and Ana B. Cerezo

Received: 24 December 2020

Accepted: 21 January 2021

Published: 22 January 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



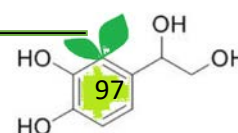
**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** New liquid effluents based on the use of acetic acid in the table olive industry make it easier to extract bioactive compounds to be used for food, cosmetic, and pharmaceutical purposes. The use of water acidified with acetic acid or in brine with or without acetic acid for storing the table olive enhances the extraction of two more active phenolic compounds: hydroxytyrosol (HT) and 3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG). This work has two aims: (1) measure the solubilization of phenolics controlled for two years using more than thirty olive varieties with different ripeness index as a potential source of HT and DHPG, and (2) evaluate the anti-inflammatory activity of the purified phenolics. The effluents with a higher concentration of phenolics were used for the extraction of HT and DHPG in order to evaluate its antioxidant and anti-inflammatory activity in vitro by the determination of pro-inflammatory cytokines such as Human Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF), Interleukin-6 (IL-6), and Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). The anti-inflammatory activity of these phenolic extracts was demonstrated by studying the expression of cytokines by qPCR and the levels of these proteins by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**Keywords:** table olive; phenolics; hydroxytyrosol; 3,4-dihydroxyphenylglycol; anti-inflammatory; antioxidant

## 1. Introduction

The biological activities of olive phenols such as oleuropein, verbascoside, hydroxytyrosol (HT), tirosol (Ty), luteolin, and apigenin 7-O-glycosides, as well as phenolic acids, which are minor constituents of olive fruits, have been widely studied [1–5]. Among them, HT stands out because of its remarkable biological activities [6]. There are many methods of synthesis of HT for obtaining and purifying it from a natural procedure (olive oil by-product) [7], some of which are currently in place in the food industry [6,8]. Only recently was a similar phenol obtained and detected in some olive sources with a high potential as an antioxidant and anti-inflammatory agent, 3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG) [9]; therefore, not much is known about its activity or its origin. Previous studies show its bioactive potential, such as its antioxidant character in different matrices such as water, pectin, or edible films [10–12] and overall, its synergistic effect was found with HT regarding the antioxidant activity in a hydrophilic matrix [13], the antioxidant effect in edible oils [9], and the inhibition of platelet aggregation [14]. The presence of phenols in virgin olive oil improves the stability of the fatty acid composition in addition to contributing to its beneficial properties [15]. DHPG is the principal metabolite of norepinephrine (NE), which is a sympathetic neurotransmitter that plays a critical role in regulating physiological processes related to the sympathetic activity in healthy and diseased states [16]. Thus,





the high synergism found between HT and DHPG together with the presence of DHPG in the sympathetic activity make the further study of DHPG as well as the search for new extraction sources crucial.

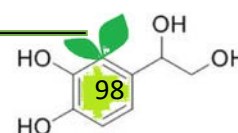
DHPG was found in olive oil wastes, mainly in alperujo or two-phase olive oil extraction waste, but the concentration was very low, mainly after the thermal treatment required for the solubilization of phenols into a liquid phase, and their extraction and purification were difficult [17]. On other hand, in a previous study, the presence of high concentrations of DHPG in natural olives has been reported [18], where low values in the ratio HT/DHPG indicate a good presence of this phenolic compound in table olives. The levels of DHPG found in all samples of natural black olives, regardless of cultivar type or processing method, were higher than in natural turning color or natural green olives. DHPG is present in natural brines during fermentation and storage, but it has not been detected in table olive treated with sodium hydroxide. The table olive is one of the most commonly consumed and popular snacks in the Mediterranean coastal zone. It contains a large range of polyphenols to which a multitude of beneficial properties is attributed, and it prevents chronic diseases such as cardiovascular, neurodegenerative, inflammatory disorders, or cancer [19]. The effluents of the olive table industry, mainly those untreated with sodium hydroxide, contain a great proportion of phenols and are a potential source of DHPG, which allows for the study of one of the most interesting properties of it. It is important to analyze the type of source used not only by the main phenols but also by their possible companions once they have been purified and also for the fact of making their extraction easier, avoiding undesired reactions. The intake of anti-inflammatory drugs is widespread, and they are used not only for their anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic properties but also for their important beneficial effects such as cardiovascular protection and cancer prevention [20]. In this sense, the number of scientific studies to determine the anti-inflammatory effects of natural compounds has increased in the last few years with the aim of preventing a wide range of diseases. Thus, the extraction of natural phytochemicals from natural sources such as by-products can help to enhance not only human health but also environmental health. In this industry, a large amount of liquid effluents is generated, mainly from the fermentation and storage steps, where the brine is the most common medium used industrially [21]. Recently, changes in the table olive industry have led to replacing the high concentration of salt in brines by the use of acetic acid or even by storing them in water that has been acidified with acetic acid without sodium chloride [22]. Thus, the presence of phenolic compounds in these kinds of liquids could be a great opportunity to obtain industrially remarkable phenolics such as HT and DHPG.

The aim of this work was to find new sources of by-products generated from the olive industry, which could contain DHPG in high concentration, and to purify it in order to evaluate its antioxidant and anti-inflammatory activity *in vitro*, which is one of its potential properties that has not been as extensively studied as the HT extracted from the same source.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Materials

Samples from nine olive varieties with a ripeness index (RI) higher than 4 and twenty-seven olive varieties with an RI of between 1.5 and 2.5 were supplied by Tecnofood I+D Solution Company, Massanassa, Valencia, Spain, and these are shown in (Table 1). The determination of ripeness index of olive samples was carried out following the method described by García et al. (1996) [23], which is a well-used method based on the color of the skin of 100 olives divided into 8 groups being subjectively evaluated according to the following characteristics: group 0, skin bright green; group 1, skin green-yellowish; group 2, skin green with reddish spots; group 3, skin reddish-brown; group 4, skin black with white flesh; group 5, skin black with <50% purple flesh; group 6, skin black with 50% purple flesh; and group 7, skin black with 100% purple flesh. The ripeness index is



determined by the equation where  $i$  is the number of the group and  $ni$  is the number of olives in it. The evaluation was performed in triplicate.

$$\text{ripeness index} = \sum(ini)/100 \quad (1)$$

**Table 1.** Samples of olives used for phenolic solubilization in brine, brine plus acid, and acid alone.

Codes	Denomination	Origin	Date
Ripeness index (RI > 4)			
1M	Alameño	Alhama (Granada)	1/11/2016
2M	Hojiblanca	Alcalá del Valle (Cadiz)	18/11/2016
3M	EP	West of Granada	18/11/2016
4M	Rara 2	Montefrío (Granada)	18/11/2016
5M	Azul 1	Alhama (Granada)	17/12/2016
6M	Hojiblanca	Écija (Seville)	5/12/2016
7M	Azul 2	Alhama (Granada)	
8M	Loaime	Alhama (Granada)	8/12/2016
9M	Alameño	Alhama (Granada)	8/12/2016
Ripeness index (1.5 < RI ≤ 2.5)			
1V	Alameño	Alhama (Granada)	1/11/2016
10V	Nevadillo	Alhama (Granada)	1/11/2016
11V	Hojiblanca	Moriles (Córdoba)	
12V	Picual	Alcalá del Valle (Cadiz)	18/11/2016
2V	Hojiblanca	Alcalá del Valle (Cadiz)	18/11/2016
3V	EP	West of Granada	18/11/2016
13V	Lucio	West of Granada	
4V	Rara 2	Montefrío (Granada)	18/11/2016
14V	Gordal	Granada	18/11/2016
15V	Chorro	Montefrío (Granada)	18/11/2016
16V	ISI-151	Montefrío (Granada)	18/11/2016
17V	COR-IG	Montefrío (Granada)	18/11/2016
18V	RAN-IG	Montefrío (Granada)	18/11/2016
19V	Picual	Écija (Seville)	5/12/2016
20V	Carrasqueño	Alcaudete (Jaén)	30/11/2016
6V	Hojiblanca	Écija (Seville)	5/12/2016
21V	Picual	Guadahortuna (Granada)	6/12/2016
22V	Lucio 80	Íllora (Granada)	13/12/2016
23V	Lucio 64	Íllora (Granada)	13/12/2016
24V	Alameño	Montilla (Cordoba)	13/12/2016
25V	Royal	Rabanales (Cordoba)	13/12/2016
7V	Azul 2	Alhama (Granada)	13/12/2016
26V	Rapasayo	Rabanales (Cordoba)	13/12/2016
27V	Ocal	Rabanales (Cordoba)	13/12/2016
28V	Hojiblanca	Montefrío (Granada)	23/12/2016
29V	480-1G	West of Granada	13/01/2017
30V	Brillante	Montefrío (Granada)	13/01/2016

## 2.2. Chemicals

Sodium chloride (NaCl) has been used as conservation liquid; HPLC grade acetonitrile, fluorescein, Trolox, and 2,2'-azobis (2-amidine-propane) dihydrochloride (AAPH) were obtained by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water system (Millipore, Milford, MA, USA). The following reagents were used for cell growth: Medium RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY, USA) 1640 w/L-Glutamine w/25 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), Fetal Bovine Serum (FBS), Trypsin 0.25% in PBS w/o Calcium w/o Magnesium w/Phenol red and Phosphate-buffered saline w/o Calcium w/o Magnesium (PBS) were purchased from Biowest (Riverside, CA, USA). A penicillin/streptomycin (P/S) solution was obtained from

Gibco® (Life Technologies SA, Alcobendas, Spain). Thiazolyl blue tetrazolium bromide Biochemical (MTT), dimethyl sulfoxide Cell culture grade (DMSO), and Trypan Blue 0.4% solution in PBS were obtained from Applichem (Darmstadt, Germany).

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), lipopolysaccharide from *Escherichia coli* 055:B5 (LPS), and Triton™ X-100 came from Sigma Chemical Co. (St. Louise, MO, USA). TRIsure™ was purchased from Bioline (London, UK). For performing reverse transcription, an iScript™ cDNA Synthesis Kit was used, and for Real-time Quantitative PCR, a SYBR Green Master Mix was used; both were from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). Primers were purchased from Eurofins Biolab S.L.U. (Barcelona, Spain). Human Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), and Interleukin-10 (IL-10) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sets were obtained from Diaclone Biotech (Besançon, France).

### 2.3. Isolation of Hydroxytyrosol (HT) and 3,4-Dihydroxyphenylglycol (DHPG) from Olive Oil By-Products

The liquid phase, with higher contents of HT and DHPG, was used for the isolation of these two phenols. The methods to purify HT and DHPG have been described and patented by Fernández-Bolaños et al. (2004) [24] and Fernández-Bolaños et al. (2010) [25], respectively. Both methods are based on physical chromatographic systems that allow the extraction of natural compounds without any organic solvent or chemical or enzymatic reactions, obtaining a purity degree over 95%, referring to dry matter.

### 2.4. Study of HT, Ty, and DHPG in Brines and Acid Solutions

In order to study the solubilization of HT, DHPG, and Ty during the storage of different olive varieties, a total of 36 varieties of natural turning color olives were collected from four different regions of Spain (Cadiz, Cordoba, Seville, and Granada) and put in three different conservation liquids for 24 months, with an average range of 0.7 L per 400 g of olives. Duplicate analyses were performed on each sample. The samples were placed in three preservation liquids based on two state of maturity (green and ripe). The conservation liquids used were those as follows: NaCl at 10%; NaCl 6–8%; and 1% acetic acid (pH < 4.2); 1% acetic acid. The samples were checked 8 times in 24 months, and the amounts of DHPG, HT, and Ty were determined by HPLC-DAD.

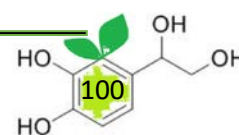
### 2.5. HPLC-DAD Analysis

The phenolic profile was determined using a high-resolution liquid chromatography system, HPLC (Hewlett-Packard 1100 series equipped with an array diode detector and an Agilent 1100 series automatic injector which introduces 20  $\mu$ L of sample). The chromatographic column used was Teknokroma Tracer Extrasil OSD2 of 5  $\mu$ m particle size and dimensions of 25  $\times$  46 internal diameter. As an eluent, HPLC grade acetonitrile (B) and mill-Q water with 0.01% in Trifluoroacetic acid (TFA) were used. The flow rate was 1 mL/min and the chromatograms were recorded at 254, 280, and 340 nm. Phenolic compounds were separated using the following gradient: 0–30 min, 5% B; 30–45 min, 25% B; 45–47 min, 50% B; 47–50 min, 0% B.

The identification and quantification of phenolic compounds were based on the comparison of the retention times (RT) and absorbance values of detected peaks in solvents with those obtained by the injection of pure standards of each analysis.

### 2.6. Antioxidant Activity Assays: Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Assay

The inhibition of oxidation induced by peroxy radicals produced by thermal oxidation of AAPH in a sample is known as the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay, and it was performed following Bermúdez-Oria et al. (2019) [12]. The reactive oxygen species (ROS) produced diminishes the fluorescence signal generated by the fluorescein. The samples were conveniently diluted with sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.4), and 25  $\mu$ L of the sample was transferred to a microplate. A blank with 25  $\mu$ L of phosphate buffer was used, while the standards were filled with 25  $\mu$ L of Trolox solutions at concen-



trations between 10 and 140  $\mu\text{M}$ . Subsequently, 150  $\mu\text{L}$  of 1  $\mu\text{M}$  fluorescein was added to all wells. The plate was incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 15 min. After this time, 25  $\mu\text{L}$  of AAPH (250 mM) were added to each well to initiate the reaction. In a plate reader (Fluoroskan Ascent<sup>™</sup>, Thermo Scientific<sup>™</sup>, Waltham, MA, USA), measurements were taken every 5 min for a period of 90 min at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 538 nm. Final ORAC values were calculated using the regression equation between Trolox concentration and area under the curve (AUC), and they were expressed as  $\mu\text{moles}$  of Trolox equivalents per  $\mu\text{moles}$  of active molecules.

## 2.7. Cell Culture and Treatments

The human monocytic THP-1 cell line was graciously provided by the Cell Biology Unit (Institute of Fats, CSIC, Seville, Spain), and it was cultured in suspension with RPMI 1640 medium using a Thermo Forma Series II Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator by Thermo Fisher Scientific at 37  $^{\circ}\text{C}$  and 5% CO<sub>2</sub>. The medium was supplemented with 1% (P/S) and 10% heat-inactivated FBS for 30 min at 56  $^{\circ}\text{C}$  for the purpose of inactivating proteins that could interfere in the immune response. Monocytes were differentiated from macrophages by incubation with 100 nmol/L of PMA for 4 days. Adherent macrophages were treated with serum-free RPMI 1640 for 24 h. Cell work was carried out in a Telster<sup>™</sup> Bio II Advance 4 Biological Safety laminar flow cabinet, and cells were examined under a Culture Microscope model Olympus CK40-CPG (London, UK).

## 2.8. Cytotoxicity Assay

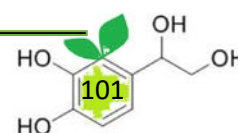
Once grown, the cells were seeded at 50,000 cells per well in 96-well plates and incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  and 5% CO<sub>2</sub> for 24 h. The concentrations used were as follows: 10, 40, 60, 80, and 100  $\mu\text{g/mL}$ . Afterwards, 100  $\mu\text{L}$  of MTT (5 mg/mL) were added and incubated for 3 h, thus favoring the formation of formazan crystals. Finally, the MTT was removed, and 100  $\mu\text{L}$  of dimethyl sulfoxide were added to dissolve the formazan. Triton<sup>™</sup> X-100 was used as a positive control, and cells in the medium were used as a negative control. Absorbance was measured in a Thermo Scientific Multiskan Spectrum spectrophotometer with a microplate reader by Thermo Fisher Scientific at 570 nm.

## 2.9. Cell Treatment

The human monocytic THP-1 cell line was cultured in suspension in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% P/S. Cells were seeded at  $5 \times 10^5$  cells/well in 12-well plates and differentiated to macrophage-like cells by treating for 4 days with PMA at 100 nmol/L [26]. In order to induce inflammatory damage to incubated cells, LPS was added in a final concentration of 0.05  $\mu\text{g/mL}$ ; then, the cells were incubated for 1 h. After that HT, DHPG and a mixture of them were added to 50  $\mu\text{g/mL}$  and incubated for 24 h.

## 2.10. RNA Extraction, RT PCR, and Quantitative PCR

After LPS stimulation, the total RNA of adherent cells was extracted using TRIsure<sup>™</sup> Bioline (London, UK). The evaluation of RNA concentration was made with spectrophotometry NanoDrop ND-1000 Uv-Vis by Thermo Scientific at 260 and 280 nm. The concentration value was provided by the device. These measurements were conducted three times for each sample, and the RNA quality obtained had a purity degree of A260/A280. Momentarily, RNA (1  $\mu\text{g}$ ) was subjected to reverse transcription (iScript, Bio-Rad, Madrid, Spain) with iScript<sup>™</sup> Reverse Transcriptase (Bio-Rad) according to the manufacturer's protocol using a MJMini<sup>™</sup> Personal Thermal Cycler by Bio-Rad. In order to perform real-time PCR amplification, 10 ng of the cDNA were taken as a template. The mRNA were quantified using iTaq Universal SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix (Bio-Rad) containing primer pairs for TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and IL-10. The Thermal Cycler used was a CFX96 Connect Real-Time System and the iCycler data analysis software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The amplified cDNA levels were compared among different groups using the standard  $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$  method. The reference



gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Hprt) and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) were used as "housekeeping". All amplification reactions were tested in triplicate, and the sequence of oligonucleotides used was corresponding as follows: Tnf- $\alpha$  (NM\_000594): 5'-TCCTTCAGACACCCTCAACC-3' and 5'-AGGCCCCAGTTTGAATTCTT-3'; IL1- $\beta$  (NM\_000576): 5'-GGGCCTCAAGGAAAAGAATC-3' and 5'-TTCTGCTTGAGAGG TGCTGA-3'; IL-6 (NM\_000600): 5'-TACCCCCAGGAGAAGATTCC-3' and 5'-TTTTCTGCCA GTGCCTCTTT-3'; Gapdh (NM\_001289746): 5'-CACATGGCCTCCAAGGAGTAAG-3' and 5'-CCAGCAGTGAGGGTCTCTCT-3'; Hprt 1 (NM\_000194): 5'-ACCCCACGAAGTGTGGA TA-3' and 5'-AAGCAGATGGCCACAGAACT-3'.

#### 2.11. Cytokine Determination by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

The levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  in culture were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 96-well microtiter MaxiSorp plates from Nunc using ELISA kits according to the manufacturer's protocol. Using calibration curves from serial dilution of human recombinant standards in each assay, the concentrations of cytokine were estimated and expressed in pg/mL.

#### 2.12. Statistical Analysis

All values are expressed as arithmetic means  $\pm$  standard deviations (SD). Data were evaluated with Graph Pad Prism Version 5.01 software (San Diego, CA, USA). The statistical significance of any difference in each parameter among the groups was evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA), following the Tukey multiple comparison test as post hoc test. *p* values of less than 0.05 were considered statistically significant.

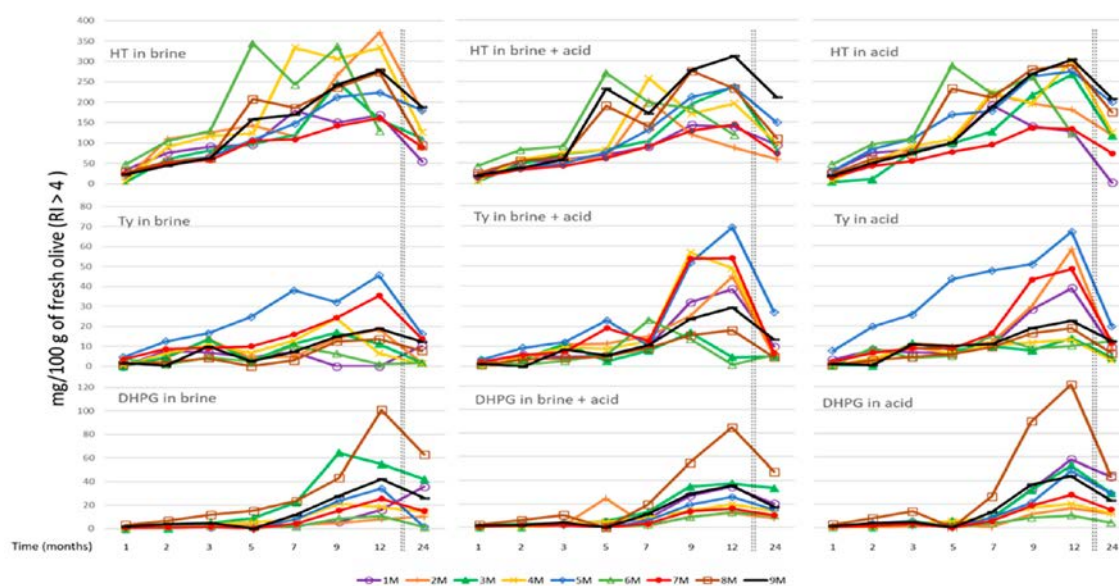
### 3. Results and Discussion

#### 3.1. Study of HT, Ty, and DHPG in Brines and Acid Solutions

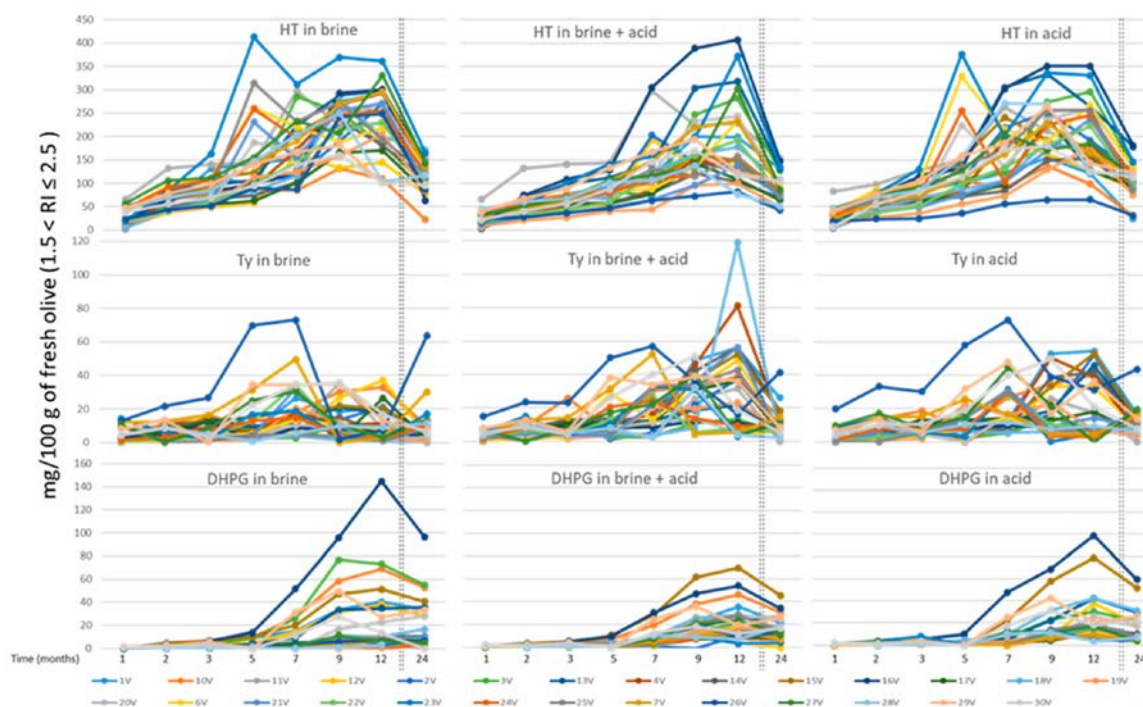
Nine samples of different varieties with a higher ripening index ( $RI > 4$ ) were used for the trial with all three types of liquids: brines, brine plus acid, and acid. Figure 1 shows the evolution of the contents of the three main simple phenolics over a two-year period. The greatest increase in concentration was observed in the case of hydroxytyrosol, especially in some varieties and where brine concentrations above 350 mg/100 g of fresh olives were reached. The use of acid accompanied or not by brine favored the extraction of tyrosol after seven weeks of storage. In the case of DHPG, the trend was that the use of acid favored a slight increase in its concentration in the absence of brine, clearly highlighting the 8M sample in the three treatments, which reached values of 120 mg/100 g of fresh olives with the acid. It was also observed that in most of the samples, the concentrations in the three phenols decreases from the year of storage in a gradual way, which could be the result of an extractive decrease and an increase in the oxidative degradation of these compounds.

In the case of the greener olives ( $1.5 \leq RI \leq 2.5$ ) (Figure 2), when the number of varieties was higher, a greater dispersion of data was observed, especially in the release of hydroxytyrosol and tyrosol, with the behavior of DHPG being more homogeneous. The maximum HT values were above 400 mg/100 g of fresh olives after five months of storage, while those of Ty were between 70 and 120 mg/100 g of fresh olives for a lower number of samples. The maximum value for DHPG was 140 mg/100 g of fresh olives for a sample preserved in brine after 12 months. In this last phenol, the concentration started to increase from the fifth month of storage, so this period was necessary for the recovery of DHPG.





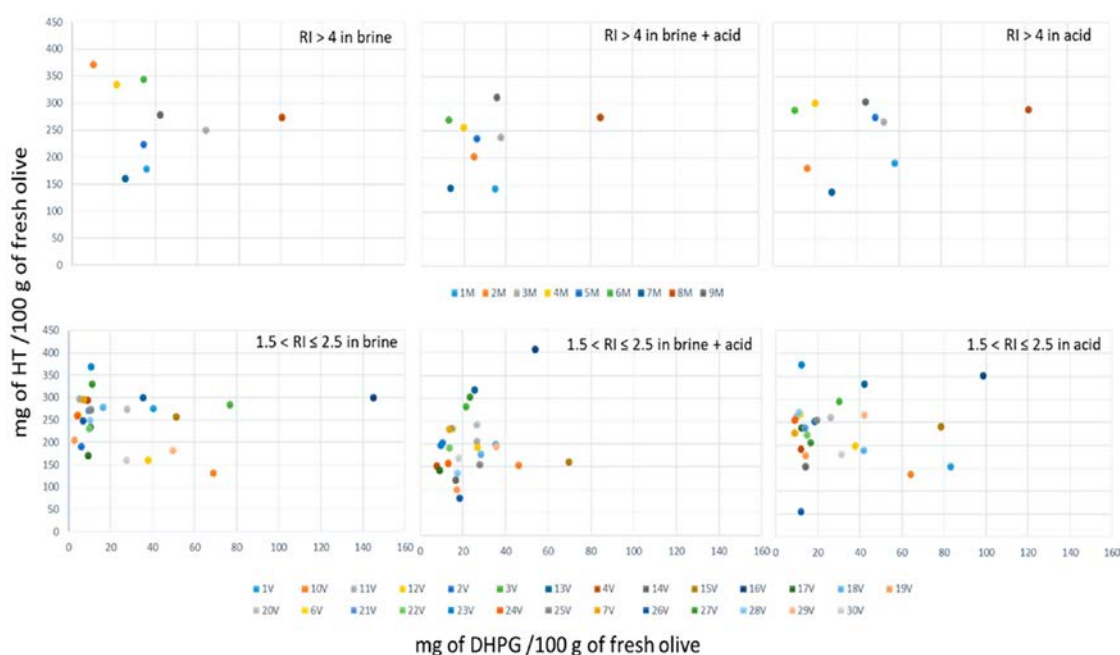
**Figure 1.** Solubilization of hydroxytyrosol (HT), tyrosol (Ty) and 3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG) during 24 months in three different storage liquids (brine, brine in acid, and acid) for nine varieties of olives with a ripeness index higher than four.



**Figure 2.** Solubilization of HT, Ty, and DHPG during 24 months in three different storage liquids (brine, brine in acid, and acid) for thirty varieties of olives with a ripeness index between 1.5 and 2.5.

In order to see the behavior of each of the ripest and greenest varieties in terms of the solubilization of phenols more clearly, the concentrations in the two most important,

HT and DHPG, are presented in (Figure 3). According to the need to recover one or the other or both, certain varieties offered important advantages. In the case of the more mature varieties, the 8M variety stood out for its high concentration in DHPG, which varied as a function of the medium between 80 and 120 mg/100 g of fresh olives, while maintaining a less variable range of HT between 270 and 300 mg/100 g of fresh olives. Other samples such as 2M presented a high HT concentration (370 mg/100 g of fresh olives) in brine and very low concentration in DHPG, halving its HT content in the case of using acid with or without brine. If a source is sought to obtain a mixture of HT with DHPG to take advantage of the synergistic effect of both compounds and improve their biological activity, all samples are useful, mainly the 8M. However, in the case where only DHPG is sought for use as a phyto regulator in which the presence of HT must be avoided, samples such as 1M or 7M in any medium would be preferably suitable.



**Figure 3.** Maximum concentration of HT versus maximum concentration of DHPG achieved during the 12 months of storage for both ripeness stages of olives—higher than 4 (nine samples) and between 1.5 and 2.5 (thirty samples).

The samples of the least ripe olives presented a different behavior; it seemed that most of the samples between 74% and 88% presented a concentration in DHPG below 40 mg/100 g of fresh olives for the three media used. In the case of the brine where the highest percentage was between 0 and 20 mg/100 g of fresh olives (63%), the addition of acid slightly improved the concentration in such phenol, but it was always below 40 mg/100 g of fresh olives in most samples. The 16V sample stood out for its high DHPG content, which reached over 140 ppm in brine, and it was between 300 and 400 mg/100 g HT from fresh olives in all media. As for HT solubilization, there was a great variation, depending on the type of olive.

In general, the ripest varieties showed a better solubilization of DHPG, which was not so clear in the case of HT. As a source of HT, most olives could be used in all three media; however, for DHPG, it seemed that the use of the ripest olives with the addition of acid was more effective.

To compare the results with those observed in the literature, the range of maximum concentrations expressed in  $\mu\text{mol/L}$  of storage liquid reached in the ripest olives was 335–4030 and 5190–13,715 for DHPG and HT, respectively. In the case of the greenest olives, they were 168–4869 and 1853–15,198  $\mu\text{mol/L}$  for DHPG and HT, respectively. There has been hardly any work done to determine the amount of DHPG in table olives and their fermentation, storage, or packaging liquids. Most of the works determine the amount of HT and its derivatives as hydrolysis products of oleuropein as the main cause of bitterness. Industrially, to eliminate this bitterness, either prolonged storage is carried out or time is reduced through the use of an alkaline treatment with NaOH. This treatment rapidly hydrolyzes the oleuropein and degrades other phenols such as DHPG. In one of the studies [27] where the solubilization of phenols from soda-treated olives was analyzed, it was observed that the maximum concentration in HT after two months of storage was 3.5 mmol/L for the manzanilla variety, or 780 mg of HT/g of fresh olive, which is higher than the values reported in this work from natural olives because of the use of NaOH.

Since the degradation of DHPG takes place at high pH, sources of this phenolic in the table olive industry have to be through natural processing where NaOH is not used. One of the few studies carried out with naturally processed olives where it was possible to quantify DHPG and HT showed that these results are above those shown in the literature [18], where the concentrations in these phenols in the packing media for natural olives produced without NaOH were determined. In this study, the maximum values found in conservation brine for the Empeltre variety of black olives were 1810  $\mu\text{g/L}$  DHPG and 7933  $\mu\text{g/L}$  HT for the Manzanilla variety. These values are again much lower than those found in this study, which can be explained by the fact that the maximum reached in this work corresponded to storage periods that may have been different from those reported in the literature and that the varieties tested had been different.

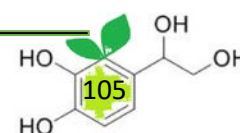
### 3.2. Extract Preparation

Three extracts were prepared for the antioxidant and anti-inflammatory activity trials. One was rich in HT from the mixture of the 27V and 23V samples, the second was rich in DHPG from the 1M, 1V, 10V, and 15V samples, and the third was a mixture of HT and DHPG using a mixture of the 8M and 16V samples. The three kinds of solutions were also mixed to obtain sufficient amounts for each purification, which was made using only water through a chromatographic system as described in the patents mentioned and without any organic solvents.

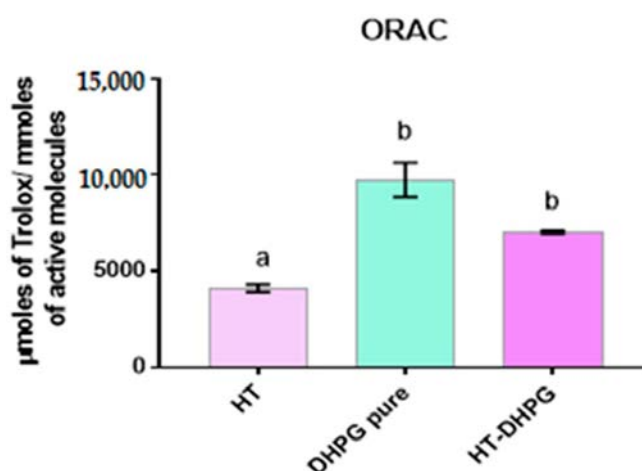
### 3.3. Antioxidant Activities

The antioxidant capacity of the three extracts was evaluated by their oxygen radical absorbance capacity (ORAC). The results obtained for the measurement of antioxidant activity by the ORAC of the sample containing a mixture of the two phenols in the ratio 1:1 and of the two phenols individually are shown in (Figure 4). It can be seen that the extract with the highest antioxidant capacity is the one rich in DHPG with 9758  $\mu\text{mol}$  of Trolox/mmol of active molecule compared to 7042  $\mu\text{mol}$  of Trolox/mmol of the active molecule of the mixed extract, which is well above the HT extract, which reached 4127  $\mu\text{mol}$  of Trolox/mmol of active molecule.

This same behavior was observed when these molecules were linked to soluble dietary fibers from the strawberry cell wall; these results were obtained after a simulated in vitro digestion with gastric and intestinal fluids. The same result was found in two different methods (DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazilo) and ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))) and suggests that the extra OH group present in the DHPG with respect to the HT molecule confers greater antioxidant capacity to the DHPG [13]. On the other hand, one could consider a possible synergistic effect when using a DHPG-HT extract in a 1:1 ratio where an increase in the antioxidant capacity is appreciated with respect to an extract solely composed of HT.







**Figure 4.**  $\mu$ moles of Trolox equivalents obtained in each extract per mmole of active molecule. Different letters indicate that there are significant differences between the results of the different extracts ( $p < 0.05$ ).

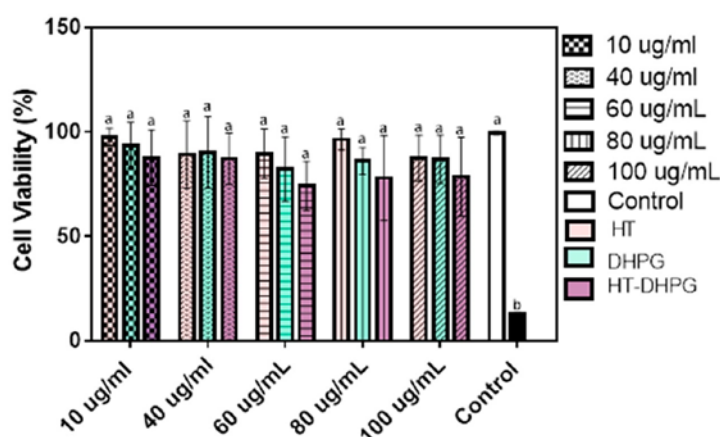
### 3.4. Viability of Cells

A cell proliferation assay was performed by the metabolic reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazole bromide (MTT) in monocytes cells in order to determine the non-toxic effect of the extracts under study and, thus, to be able to evaluate their anti-inflammatory capacity. They were conveniently differentiated into adherent macrophages, which were taken as a model of human macrophages derived from THP-1 cell line, whose immortal cell model served to study the anti-inflammatory response against the use of macrophages of tissue origin. This type of test is one of the most commonly used for its simplicity and speed [28].

In monocytes derived from THP-1, the toxicity of the extracts tested in concentrations from 10 to 100 ppm with respect to the control of living cells after 24 h of treatment was very low or null; or in other words, the cellular viability was very high or 100%, and there were no significant differences with respect to the control, so it could be said that DHPG, HT, and the mixture of both extracts did not exert any damage on the cellular integrity in this cellular model. As shown in (Figure 5), the HT, DHPG extracts, and their mixture did not show any growth inhibition effects in human cells in a dose-dependent way. The capacity of HT to protect healthy cells has been reported in other studies where it was observed that HT presented a viability of more than 60%, even when they had undergone previous oxidation with  $H_2O_2$  [29]. In fact, the anti-proliferative capacity of HT has been reported in other unhealthy cell lines such as HeLa and DG75 [30], which was very promising in the fight against neurodegenerative diseases.

### 3.5. Anti-Inflammatory Activity

One of the objectives of this work is focused on the verification of the anti-inflammatory biological properties of HT and DHPG extracts obtained individually and in combination.

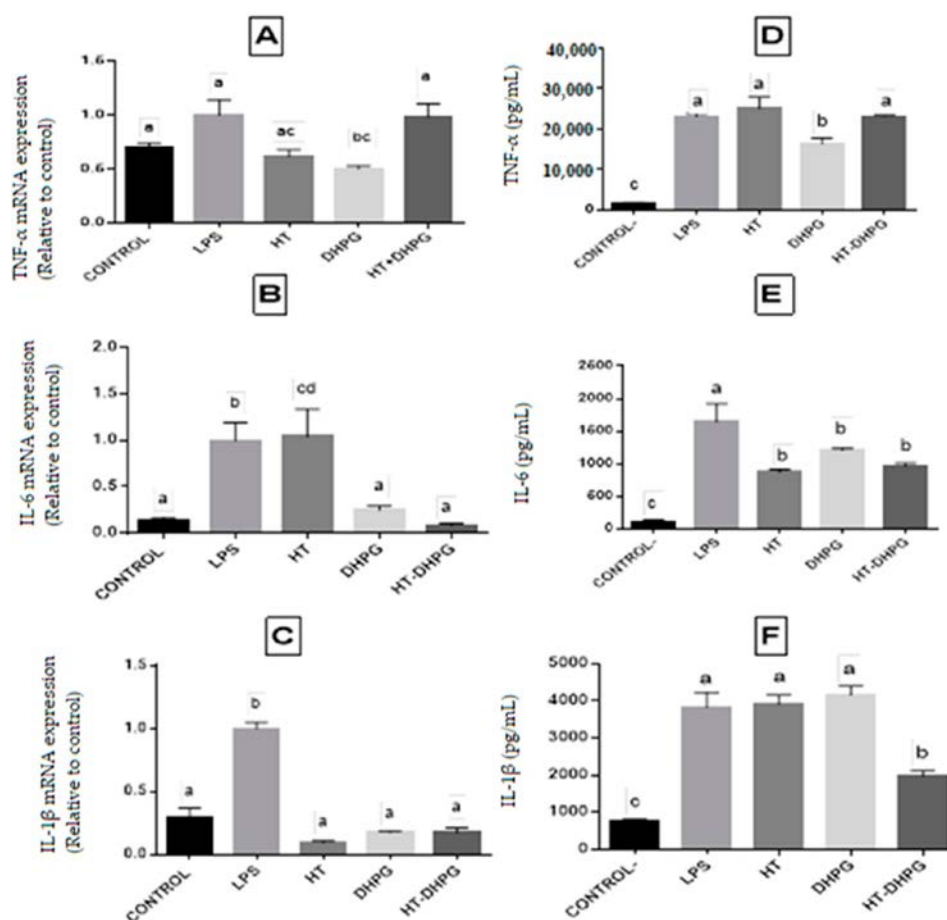


**Figure 5.** Cell viability (%) determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazole bromide (MTT) assay, in the presence of three different extracts HT, DHPG, and HT-DHPG, after 3 h of treatment and different concentrations (10, 40, 60, 80, and 100  $\mu\text{g/mL}$ ). Values marked with different letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

In order to analyze the anti-inflammatory capacity *in vitro*, tests were carried out with LPS, which is a lipopolysaccharide from *Escherichia coli* and induces inflammation in the phagocytic cells that secrete pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$ ). The release of these cytokines by the cells is the main indicator of the inflammatory state, considering that if the extract inhibits the gene expression of any pro-inflammatory cytokine, it could be used as a possible remedial drug to fight inflammation.

Once the cell damage has been produced, the cells adhered to the culture plate are separated from the supernatants, and the gene expression study is carried out using quantitative PCR techniques for the three pro-inflammatory cytokines. In THP-1, the results obtained indicate that the three extracts tested reduced the gene expression of the cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  against the control of LPS (Figure 6).

In the case of the tumor necrosis factor, the HT and DHPG extracts were significantly lower than the control, while in the mixture of the two phenols, this difference was not appreciated. In the case of Interleukin IL-1 $\beta$ , a drastic reduction was observed for the three extracts tested as well as in the case of Interleukin IL-6, where the DHPG extracts and the mixture showed an expression that did not present significant differences compared to the control of undamaged cells. There are studies that affirm that the HT isolated from virgin olive oil has anti-inflammatory activity in THP-1, inhibiting the antioxidant action by suppressing the induction of NO release by LPS in THP-1 in addition to the decrease in the gene expression of TNF- $\alpha$ , inducible nitric oxide synthase i-NOS, and cyclooxygenase COX-2 [31,32]. There are also authors who affirm that HT improves the ulcerative colitis in models of peritoneal cells in murine induced by dextran sodium sulfate (DSS) [33]. However, to our knowledge, there are no studies on the evaluation of pro-inflammatory cytokines that demonstrate the anti-inflammatory capacity as in the case of DHPG and HT-DHPG mixture, and the trials presented in this work demonstrate for the first time that these molecules could be used as possible inhibitors of inflammatory processes.



**Figure 6.** Human Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF) (A), Interleukin-6 (IL-6) (B), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (C) mRNA expression in THP-1-derived macrophages after 24 h of treatment with or without lipopolysaccharide (LPS) (100 ng/mL) and HT, DHPG and HT-DHPG. Cytokine secretion of TNF (D), IL-6 (E), and IL-1 $\beta$  (F) production of THP-1-derived macrophages after 24 h of treatment with or without LPS (100 ng/mL) and HT, DHPG, and HT-DHPG. Values marked with different letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

On the other hand, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 have been quantified in the cells' supernatants through enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for each cytokine, and the cells treated with DHPG were shown to secrete a smaller amount of cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 to the medium than the control with the inflammation inducer, which coincides with the results obtained from the gene expression. On the other hand, the cells treated with the HT extract decreased the concentration in the cytokine IL-6 in the medium with regard to the control. The synergic power of the DHPG and HT mixture in the secretion of IL-1 $\beta$  and IL-6 is significant, and it could add a new biological property of synergy to this phenolic union.

#### 4. Conclusions

The effluents generated in the table olive industry during the natural fermentation and the storage in brine, brine plus acetic acid, or an acetic acid solution alone have been shown in the present study as important sources of HT and DHPG. The best results for the solubilization of the three phenols have been obtained when the acid has been used in the storage of the analyzed olives. The use of brine and acid separately or together

leads to different solubilization of the three phenolics studies depending on the olive variety and the ripeness index, but all the cases produce liquid sources in which the phenolics can be industrially extracted. Despite the fact that the table olive industry is seasonal, storage in brine and/or acid improved the solubilization of phenolics for up to 12 months, which can be used throughout the year for the extraction of these bioactive compounds. The anti-inflammatory activity of these phenolic extracts was demonstrated by studying the expression of cytokines by qPCR and the levels of these proteins by ELISA. It can be through these results that it is possible to obtain phenolic compounds with anti-inflammatory capacity that could be used as good drugs to treat diseases of inflammatory origin.

**Author Contributions:** Conceptualization, Á.F.-P. and G.R.-G.; Data curation, M.d.C.M.-L.; Formal analysis, Á.F.-P., A.B.-O. and G.R.-G.; Investigation, Á.F.-P., J.F.-B., J.A.E.-C. and G.R.-G.; Methodology, M.d.C.M.-L. and G.R.-G.; Supervision, J.F.-B., J.A.E.-C. and G.R.-G.; Validation, A.B.-O.; Writing—original draft, Á.F.-P., M.d.C.M.-L. and G.R.-G.; Writing—review & editing, Á.F.-P., J.F.-B., J.A.E.-C. and G.R.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data are available from the corresponding author upon reasonable request.

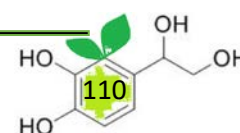
**Acknowledgments:** This research was supported by the incentives for agents of the Andalusian knowledge system, aid under the Andalusian research, development and innovation plan (PAIDI 2020) (project P18-TP-616), and the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness Ramon y Cajal Programme (RyC2012-10456). The authors wish to thank the technical Director of AGROINSUR INGENIEROS S.L., Spain, José Juan Jiménez Lopez, for supplying some of the samples used in this work.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

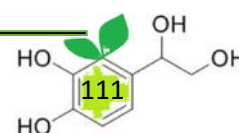
- Alagna, F.; Mariotti, R.; Panara, F.; Caporali, S.; Urbani, S.; Veneziani, G.; Esposto, S.; Taticchi, A.; Rosati, A.; Rao, R.; et al. Olive phenolic compounds: Metabolic and transcriptional profiling during fruit development. *BMC Plant Biol.* **2012**, *12*, 162. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Vinha, A.F.; Ferreres, F.; Silva, B.M.; Valentão, P.; Gonçalves, A.; Pereira, J.A.; Oliveira, M.B.; Seabra, R.M.; Andrade, P.B. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chem.* **2005**, *89*, 561–568. [\[CrossRef\]](#)
- Kanakis, P.; Termentzi, A.; Michel, T.; Gikas, E.; Halabalaki, M.; Skaltsounis, A.L. From olive drupes to olive OilAn HPLC- orbitrap-based qualitative and quantitative exploration of olive key metabolites. *Planta Med.* **2013**, *79*, 1576–1587.
- Lama-Muñoz, A.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; Rubio-Senent, F.; Palacios-Díaz, R.; Fernández-Bolaños, J. A study of the precursors of the natural antioxidant phenol 3,4-dihydroxyphenylglycol in olive oil waste. *Food Chem.* **2013**, *140*, 154–160. [\[CrossRef\]](#)
- Silva, S.; Gomes, L.; Leitão, F.; Coelho, A.V.; Boas, L.V. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. Fruits and leaves. *Food Sci. Technol. Int.* **2006**, *12*, 385–396. [\[CrossRef\]](#)
- Fernández-Bolaños, J.; Rodríguez, G.; Rodríguez, R.; Heredia, A.; Guillén, R.; Jiménez, A. Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or ‘alperujo’. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6804–6811. [\[CrossRef\]](#)
- Fernandez-Bolanos, J.G.; Lopez, O.; Fernandez-Bolanos, J.; Rodríguez-Gutiérrez, G. Hydroxytyrosol and Derivatives: Isolation, Synthesis, and Biological Properties. *Curr. Org. Chem.* **2008**, *12*, 442–463. [\[CrossRef\]](#)
- Lama-Muñoz, A.; Rubio-Senent, F.; Bermúdez-Oria, A.; Fernández-Bolaños, J.; Prior, Á.F.; Rodríguez-Gutiérrez, G. The use of industrial thermal techniques to improve the bioactive compounds extraction and the olive oil solid waste utilization. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2019**, *55*, 11–17. [\[CrossRef\]](#)
- Rodríguez, G.; Lama, A.; Trujillo, M.; Espartero, J.L.; Fernández-Bolaños, J. Isolation of a powerful antioxidant from *Olea europaea* fruit-mill waste: 3,4-Dihydroxyphenylglycol. *LWT-Food Sci. Technol.* **2009**, *42*, 483–490. [\[CrossRef\]](#)
- Del Rio, D.; Rodríguez-Mateos, A.; Spencer, J.P.E.; Tognolini, M.; Borges, G.; Crozier, A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *18*, 1818–1892. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

11. Bermúdez-Oria, A.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; Rubio-Senent, F.; Fernández-Prior, Á.; Fernández-Bolaños, J. Effect of edible pectin-fish gelatin films containing the olive antioxidants hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol on beef meat during refrigerated storage. *Meat Sci.* **2019**, *148*, 213–218. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Bermúdez-Oria, A.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; Fernández-Prior, Á.; Vioque, B.; Fernández-Bolaños, J. Strawberry dietary fiber functionalized with phenolic antioxidants from olives. Interactions between polysaccharides and phenolic compounds. *Food Chem.* **2019**, *280*, 310–320. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Rodríguez, G.; Rodríguez, R.; Fernández-Bolaños, J.; Guillén, R.; Jiménez, A. Antioxidant activity of effluents during the purification of hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl glycol from olive oil waste. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *224*, 733–741. [\[CrossRef\]](#)
14. De Roos, B.; Zhang, X.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; Wood, S.; Rucklidge, G.J.; Reid, M.D.; Duncan, G.J.; Cantlay, L.L.; Duthie, G.G.; O’Kennedy, N. Anti-platelet effects of olive oil extract: In vitro functional and proteomic studies. *Eur. J. Nutr.* **2011**, *50*, 553–562. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Dordevic, D.; Kushkevych, I.; Jancikova, S.; Zeljkovic, S.C.; Zdarsky, M.; Hodulova, L. Modeling the effect of heat treatment on fatty acid composition in home-made olive oil preparations. *Open Life Sci.* **2020**, *15*, 606–618. [\[CrossRef\]](#)
16. Denfeld, Q.E.; Habecker, B.A.; Woodward, W.R. Measurement of plasma norepinephrine and 3,4-dihydroxyphenylglycol: Method development for a translational research study. *BMC Res. Notes* **2018**, *11*, 4–9. [\[CrossRef\]](#)
17. Rubio-Senent, F.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; Lama-Muñoz, A.; Fernández-Bolaños, J. New Phenolic Compounds Hydrothermally Extracted from the Olive Oil Byproduct Alperujo and Their Antioxidative Activities. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 1175–1186. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Rodríguez, G.; Lama, A.; Jaramillo, S.; Fuentes-Alventosa, J.M.; Guillen, R.; Jimenez-Araujo, A.; Rodriguez-Arcos, R.; Fernandez-Bolaños, J. 3,4-Dihydroxyphenylglycol (DHPG): An Important Phenolic Compound Present in Natural Table Olives. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6298–6304. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Cory, H.; Passarelli, S.; Szeto, J.; Tamez, M.; Mattei, J. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Front. Nutr.* **2018**, *5*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
20. Olusanya, T.O.B.; Ahmad, R.R.H.; Ibegbu, D.M.; Smith, J.R.; Elkordy, A.A. Liposomal drug delivery systems and anticancer drugs. *Molecules* **2018**, *23*, 907. [\[CrossRef\]](#)
21. Barranco, C.R.; Balbuena, M.B.; García, P.G.; Fernandez, A.G. Management of spent brines or osmotic solutions. *J. Food Eng.* **2001**, *49*, 237–246. [\[CrossRef\]](#)
22. Anagnostopoulos, D.A.; Goulas, V.; Xenofontos, E.; Vouras, C.; Nikoloudakis, N.; Tsaltas, D. Benefits of the Use of Lactic Acid Bacteria Starter in Green Cracked Cypriot Table Olives Fermentation. *Food* **2020**, *9*, 17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. García, J.M.; Seller, S.; Pérez-Camino, M.C. Influence of Fruit Ripening on Olive Oil Quality. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 3516–3520. [\[CrossRef\]](#)
24. Fernandez-Bolaños, J.; Heredia, A.; Gutierrez, R.; Arcos, R.R.; Araujo, A.J.; Bejarano, R.G. (12) Patent Application Publication (10) Pub. No.: US 2004/0102657 A1, 27 May 2004.
25. Fernández-Bolaños Guzmán, J.; Guillén Bejarano, R.; Jiménez Araujo, A.; Rodríguez-Arcos, R.; Rodríguez-Gutiérrez, G.; Lama Muñoz, A. Method for Purifying 3,4-Dihydroxyphenylglycol (DHPG) from Plant Products. WO2010070168A1, 24 June 2010.
26. Del Carmen Millán-Linares, M.; Bermúdez, B.; del Mar Yust, M.; Millán, F.; Pedroche, J. Anti-inflammatory activity of lupine (*Lupinus angustifolius* L.) protein hydrolysates in THP-1-derived macrophages. *J. Funct. Foods* **2014**, *8*, 224–233. [\[CrossRef\]](#)
27. Ramírez, E.; Brenes, M.; García, P.; Medina, E.; Romero, C. Oleuropein hydrolysis in natural green olives: Importance of the endogenous enzymes. *Food Chem.* **2016**, *206*, 204–209. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Bahuguna, A.; Khan, I.; Bajpai, V.K.; Kang, S.C. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh J. Pharmacol.* **2017**, *12*, 115–118. [\[CrossRef\]](#)
29. Torul, H.; Küçükboyacı, N.; Tamer, U.; Karasu, Ç. Evaluation of phenolic compounds and protective effects of olive (*Olea europaea* L.) leaf extracts on endothelial cells against hydrogen peroxide-induced toxicity. *J. Res. Pharm.* **2020**, *24*, 497–507. [\[CrossRef\]](#)
30. Bouaziz, M.; Lassoued, S.; Bouallagui, Z.; Smaoui, S.; Gargoubi, A.; Dhoubi, A.; Sayadi, S. Synthesis and recovery of high bioactive phenolics from table-olive brine process wastewater. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9238–9246. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Zhang, X.; Cao, J.; Zhong, L. Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* **2009**, *379*, 581–586. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Bitler, C.M.; Viale, T.M.; Damaj, B.; Crea, R. Hydrolyzed olive vegetation water in mice has anti-inflammatory activity. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 1475–1479. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Sánchez-Fidalgo, S.; Villegas, I.; Aparicio-Soto, M.; Cárdeno, A.; Rosillo, M.A.; González-Benjumea, A.; Marset, A.; López, Ó.; Maya, I.; Fernández-Bolaños, J.G.; et al. Effects of dietary virgin olive oil polyphenols: Hydroxytyrosyl acetate and 3,4-dihydroxyphenylglycol on DSS-induced acute colitis in mice. *J. Nutr. Biochem.* **2015**, *26*, 513–520. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)



# Capítulo IV

Use of 3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG) as a plant growth regulator.



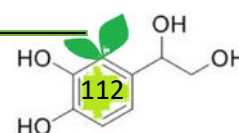
## Resumen Capítulo IV

Como resultado de los estudios realizados sobre la actividad fitorreguladora del 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) se procedió a la elaboración de este documento para proteger la propiedad intelectual de su uso en este campo. La presente invención se refiere al uso del DHFG, cualquier composición que lo comprenda y métodos de uso de los mismos, como fitorreguladores efectivos con el fin de potenciar el crecimiento de cultivos, así como para frenar o controlar el crecimiento de malas hierbas.

Las plantas generan un gran número de metabolitos secundarios que en algunos casos se comportan como reguladores del crecimiento endógeno, modificando y regulando su metabolismo, así como el de plantas que crecen de forma adyacente a ellas o inhibiendo la germinación de semillas competidoras. A estas especies se les denomina fitorreguladores o sustancias aleloquímicas. Este proceso se conoce como alelopatía y está mediado por compuestos de distinta naturaleza entre los que se destacan los fenoles.

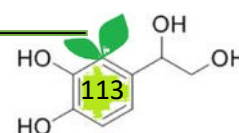
Estos compuestos además de naturales pueden ser sintetizados y su uso está ampliamente extendido en la agricultura convencional. Sin embargo, la proliferación y el uso indiscriminado de éstos ha ocasionado que la normativa agrícola se vea obligada a restringir su empleo, puesto que pueden llegar a ser perjudiciales para la salud humana y para los ecosistemas.

El objetivo de esta patente surgió de la búsqueda de nuevos compuestos con actividad fitorreguladora obtenidos a partir de subproductos de la industria agroalimentaria, con el propósito de poner en valor dichos subproductos y minimizar el impacto que ellos suponen para el medio ambiente. En base a ello, se ha desarrollado un fitorregulador efectivo para el tratamiento de cultivos y malas hierbas, que activa la germinación de



semillas y el crecimiento de las plantas del cultivo agrícola mientras que elimina las malas hierbas, en ocasiones a dosis muy bajas. Este compuesto es el DHFG que se encuentra presente en varias fuentes de la industria del aceite de oliva. En ensayos tanto de germinación como de post-emergencia, se ha encontrado que la aplicación de una dosis de 400 ppm de ingrediente activo del fitorregulador, inhibe la germinación total de vallico, *Lolium sp.*, (mala hierba habitual en cereales) mientras que esta misma dosis no solo no resulta tóxica para el cultivo de trigo sino que favorece su germinación y crecimiento. Para su uso en campo se ha comprobado la necesidad del uso de adyuvantes tecnológicos como el Biopower y la parafina que mejoren su penetrabilidad a través de las hojas y las raíces, y su estabilidad frente a los factores externos. Las principales ventajas que se han encontrado en ensayos tanto de germinación de semillas como de ensayos post emergencia en campo son los que se enumeran a continuación:

- Efectivo a dosis bajas.
- Producto natural no tóxico, no contamina, no genera resistencias, su uso reiterado no comporta riesgos para el cultivo, el medio ambiente o la salud humana.
- Puede ser usado en agricultura ecológica y producción integrada. Alternativa sostenible a los agroquímicos de síntesis.
- Contribución a la economía circular, mediante la valorización de subproductos
- Control efectivo de malas hierbas resistentes a herbicidas tipo glifosato.





## (12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional(10) Número de publicación internacional  
**WO 2018/083361 A1**(43) Fecha de publicación internacional  
11 de mayo de 2018 (11.05.2018)

WIPO | PCT

(51) Clasificación internacional de patentes:  
A01N 31/16 (2006.01)

TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2017/070724

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Fecha de presentación internacional:  
31 de octubre de 2017 (31.10.2017)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P 201631404 03 de noviembre de 2016 (03.11.2016) ES

(71) Solicitantes: CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; C/ Serrano, 117, 28006 Madrid (ES). TECNOFOOD ID SOLUCIONES, S.L. [ES/ES]; C/ Paz 4, 3º G, 18360 Huétor Tájar (Granada) (ES).

## Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(72) Inventores: RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ, Guillermo; INSTITUTO DE LA GRASA (IG), Universidad Pablo de Olavide, Edificio 46, Ctra. de Utrera, km 1, 41013 Sevilla (ES). FERNÁNDEZ-BOLAÑOS GUZMÁN, Juan; INSTITUTO DE LA GRASA (IG), Universidad Pablo de Olavide, Edificio 46, Ctra. de Utrera, km 1, 41013 Sevilla (ES). GARCÍA BORREGO, Aránzazu; INSTITUTO DE LA GRASA (IG), Universidad Pablo de Olavide, Edificio 46, Ctra. de Utrera, km 1, 41013 Sevilla (ES). ESPEJO CALVO, Juan Antonio; TECNOFOOD ID SOLUCIONES, S.L., C/ Paz 4, 3º G, 18360 Huétor Tájar (Granada) (ES). ROJANO DELGADO, Antonia M.; TECNOFOOD ID SOLUCIONES, S.L., C/ Paz 4, 3º G, 18360 Huétor Tájar (Granada) (ES). FERNÁNDEZ PRIOR, María África; TECNOFOOD ID SOLUCIONES, S.L., C/ Paz 4, 3º G, 18360 Huétor Tájar (Granada) (ES).

(74) Mandatario: PONS ARIÑO, Ángel; Glorieta de Rubén Darío, 4, 28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH,

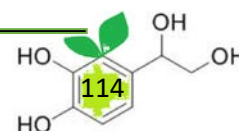
(54) Title: USE OF 3,4-DIHYDROXYPHENYLGLYCOL (DHPG) AS A PLANT GROWTH REGULATOR

(54) Título: USO DEL 3,4-DIHIDROXIFENILGLICOL (DHFG) COMO FITORREGULADOR

(57) Abstract: The present invention relates to the use of the compound 3,4-dihydroxyphenylglycol (DHPG), compositions containing same, and methods for using said compositions as effective plant growth regulators for the treatment of crops and weeds.

(57) Resumen: La presente invención se refiere al uso del compuesto 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG), composiciones que lo comprendan y métodos de uso de los mismos como fitorreguladores efectivos para el tratamiento de cultivos y malas hierbas.

WO 2018/083361 A1



WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

1

**USO DEL 3,4-DIHIDROXIFENILGLICOL (DHFG) COMO FITORREGULADOR**

La presente invención puede englobarse en el campo de la bioquímica o fisiología vegetal y agricultura. Se refiere al uso del compuesto 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG), composiciones que lo comprendan y métodos de uso de los mismos, como fitorreguladores efectivos para potenciar el crecimiento de cultivos, así como para controlar el crecimiento de las malas hierbas.

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

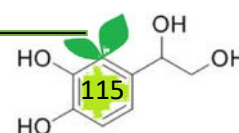
10

Las plantas sintetizan reguladores de crecimiento endógenos que participan de forma esencial en su fisiología por lo que gran parte de las prácticas agronómicas actuales incluyen el uso de compuestos, en su mayoría sintéticos, con propiedades análogas a estos reguladores, para modificar el metabolismo y así incrementar el rendimiento de los cultivos, y/o la calidad de los frutos, así como eliminar las malas hierbas. Por esta razón, los fabricantes de agroquímicos se encuentran en una constante búsqueda de vías para obtener nuevos o mejores compuestos y métodos para regular el metabolismo de las plantas y en consecuencia incrementar los rendimientos de los cultivos.

20

Muchos de los reguladores de crecimiento, incluyen compuestos como los ácidos carboxílicos, análogos de azúcares y aminos que tienen capacidad de inducir diversos efectos en las plantas (Alexieva, 1994, Compt. Rend . Acad . Bulg . Sci. 47, 779-82). En el cultivo del maíz se ha demostrado que los tratamientos con ácidos polihidroxicarboxílicos incrementan el crecimiento de la raíz (Gur *et al*, 1987, Physiologia Plantarum. 69, 633-638) y la formación de pelos radiculares, lo que favorece una mejor absorción de nutrientes.

En relación al potencial fitorregulador de las aminos se sabe que afectan a procesos esenciales de las plantas como la floración, germinación, el crecimiento y la senescencia de las hojas, entre otros. (Shih *et al*, 1982, I. Plant. Physiol. 70, 1592-1596). De manera interesante, estudios han establecido que ciertas aminos con efecto regulador del crecimiento de plantas, pueden afectar también el desarrollo y fisiología de hongos fitopatógenos (Havis *et al*, 1997, J. Agric. Food . Chem. 45, 2341-2344). De la misma manera, se ha reportado que los análogos de azúcares pueden interferir en



WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

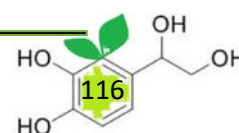
2

el crecimiento de hongos, reduciendo los daños que estos puedan causar (El Gaouth *et al*, 1995, Plant. Dis. 79, 254-278).

Otro tipo de moléculas con capacidad fitorreguladora son los derivados nitrados de ácidos fenólicos, particularmente el o-nitrofenolato, el p-nitrofenolato y el 5-nitroguayacolato (Górník y Grzesik, 2005, Folia Horticulturae. 17, 119-127). Aunque estos compuestos también tienen capacidad de afectar el desarrollo de hongos fitopatógenos, su uso ha sido restringido solo al de fitorreguladores para limitar su dosis debido a riesgos potenciales. (Diario Oficial de la Unión Europea, 19.2.2009, 48/5-48/12).

Sin embargo, la proliferación y el uso indiscriminado de fitorreguladores sintéticos han ocasionado que la normativa agrícola se vea obligada a restringir el empleo de compuestos químicos que provoquen alteraciones y disfunciones hormonales en los cultivos o que resulten tóxicos. Asimismo, el uso intensivo de pesticidas químicos para el control de plagas y enfermedades, ha ocasionado que los organismos causales desarrollen resistencia, obligando al uso de dosis cada vez mayores o el desarrollo de productos más tóxicos. Estos aspectos incrementan el nivel de riesgo sobre la salud de los ecosistemas, la salud de los agricultores y el consumidor final.

Así, en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad fitorreguladora, se ha dirigido la investigación a la obtención de biomoléculas/extractos de interés a partir de subproductos de la agroindustria, con el objeto de revalorizar dichos subproductos y minimizar el impacto medioambiental, y permitir el desarrollo de una nueva industria biotecnológica cercana y/o dependiente de la agroindustria proveedora de la fuente de los subproductos. Por otro lado, se ha aplicado técnicas biotecnológicas, a través de *screening* de bioactividades *in vitro* en laboratorio e *in vivo* a través de ensayos de campo, de dichas biomoléculas extraídas, para el diseño posterior de fitorreguladores naturales (antimicrobianos, antifúngicos, insecticidas, acaricidas y anti-germinativos para el control de malas hierbas), destinados para su uso fundamentalmente en los sectores de agricultura ecológica y producción integrada, que presentan actualmente más demanda, pero también en agricultura convencional con el objeto de reducir la aplicación de fitosanitarios procedentes de síntesis química.



WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

3

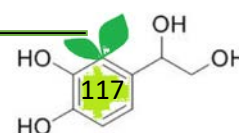
Por tanto, es importante el desarrollo de biomoléculas y/o extractos que las comprendan como nuevos fitorreguladores, no tóxicos o de baja toxicidad, encaminadas a incrementar la producción de los cultivos.

## 5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Para solucionar las limitaciones mencionadas anteriormente, es objeto general de la invención proveer el uso de un compuesto, preferentemente obtenido como subproducto de la industria, más preferentemente de la industria del aceite de oliva y/o  
10 de la industria de la aceituna de mesa, una composición que lo comprenda, y un método para su uso como un fitorregulador efectivo.

Los inventores han demostrado por un lado que el 3,4 dihidroxifenilglicol (DHFG) es un efectivo fitorregulador, tanto para el control de la germinación y crecimiento de cultivos  
15 agrícolas, así como un potente herbicida frente a las malas hierbas. Además, por otro lado, los inventores han demostrado que este fenol es un componente importante en la fracción fenólica de los subproductos de la aceituna, tanto en la industria del aceite de oliva como de la industria de la aceituna de mesa pudiendo así favorecer el aprovechamiento y reciclado de dichos subproductos. En este sentido, la presente  
20 invención demuestra que el DHFG es un compuesto denominado aleloquímico dado que proporciona beneficios, sobre todo competitivos, en plantas, principalmente dirigidos a un incremento sobre la germinación, crecimiento o desarrollo, y por otro lado, también es capaz de inducir efectos negativos sobre otras plantas, preferentemente malas hierbas, inhibiendo su germinación e impidiendo el crecimiento  
25 de las mismas. A estas sustancias que presentan dicha dualidad se les denomina, como hemos mencionado anteriormente, aleloquímicos. Dicha definición abarca tanto los efectos perjudiciales como los beneficiosos. Es necesario puntualizar que muchas sustancias con actividad alelopática tienen efectos beneficiosos a muy bajas concentraciones y, superado un determinado umbral, actúan negativamente.

30 Por tanto, el uso del DHFG, o de un extracto rico en dicho compuesto, es decir que comprenda una concentración mínima de al menos 1 ppm de DHFG, o alternativamente de entre 0.001-50 g/L de DHFG, obtenido a partir de subproductos derivados de la extracción del aceite de oliva (alpechines, aguas de decantación,  
35 aguas de centrifuga vertical, aguas de lavado, alperujo, orujo, agua de alperujo, etc..)



WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

4

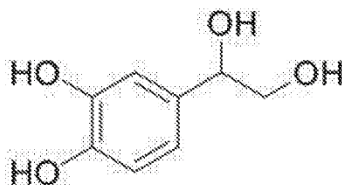
y/o de la industria de aderezo de la aceituna, también conocida como la industria de la aceituna de mesa (agua de cocido, aguas de lavado, salmueras, líquidos de conservación, etc.) como fitorregulador presenta las siguientes ventajas:

- Al ser un producto natural y que puede ser obtenido de forma física no es tóxico, no contamina, y no genera resistencias en los cultivos, y menos a las concentraciones activas.
- Presenta una alta efectividad como herbicida cuando se usa en un rango de concentraciones de entre 100 ppm a 50000 ppm de DHFG (mg DHFG en 1 kg de producto).
- Presenta una alta efectividad como bioestimulante de la germinación y crecimiento de los cultivos cuando se usa en un rango de concentraciones de entre 1 a 1500 ppm de DHFG.
- Aprovechamiento de subproductos de la industria almazarera y/o de la aceituna de mesa para conseguir un mayor valor añadido a los mismos.

Así, un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de 3,4 dihidroxifenilglicol (DHFG) como fitorregulador.

A efectos de la presente invención el término fitorregulador se refiere a cualquier compuesto capaz de inducir el crecimiento de plantas, preferentemente cultivos agrícolas. A efectos de la presente invención, dicho término también hace referencia a aquéllos compuesto que son capaces de inhibir el crecimiento de malas hierbas, teniendo por tanto actividad herbicida.

- El 3,4 DHFG es un compuesto perteneciente al grupo de los fenoles y forma parte de la familia de los glucósidos fenilpropanoides. El número de CAS del DHFG es: 28822-73-3; y su fórmula:





WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

5

En una realización particular, el compuesto DHFG descrito en la presente invención como fitorregulador, puede obtenerse a partir de subproductos derivados de la extracción del aceite de oliva y/o de la industria de aderezo de la aceituna. En otra realización más particular, el extracto rico en DHFG obtenido de los subproductos comprende al menos una composición/concentración de DHFG de al menos 1 ppm (mg/kg).

A efectos de la presente invención el término "extracto rico en DHFG" se refiere a subproductos obtenidos de la industria de la extracción de aceite de oliva y/o de la industria de aderezo de la aceituna, mezcla de dichos subproductos o fracciones obtenidas a partir de los subproductos o de sus mezclas, que comprende al menos 1 ppm de DHFG, preferentemente de 1 a 50000 ppm, o alternativamente de entre 0.001-50 g/L de DHFG.

En otra realización más preferida, la actividad fitorreguladora del uso del DHFG se selecciona entre actividad herbicida frente a malas hierbas o actividad bioestimulante/potenciadora del crecimiento de cultivos agrícolas.

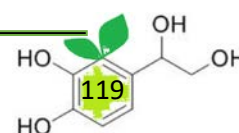
A efectos de la presente invención el término herbicida se refiere a cualquier compuesto químico capaz de controlar o eliminar especies vegetales indeseadas.

En otra realización más preferida, el compuesto DHFG muestra actividad herbicida cuando se utiliza a una concentración de entre 100 a 50000 ppm, más preferentemente de entre 500 a 9000 ppm.

A efectos de la presente invención el término potenciador del crecimiento de cultivos o bioestimulante se refiere a cualquier compuesto capaz de inducir el crecimiento de plantas e incrementar el rendimiento de los cultivos en general.

En otra realización más preferida, el compuesto DHFG muestra actividad potenciadora del crecimiento de los cultivos agrícolas cuando se utiliza a una concentración de entre 1 a 1500 ppm, más preferentemente de entre 1 a 500 ppm.

En otra realización preferida, el DHFG se usa en combinación con al menos un adyuvante.



WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

6

A efectos de la presente invención el término adyuvante se refiere a sustancias químicas que ayudan a mejorar las características y propiedades de un compuesto o sustancia química, de modo que la composición final no sea tóxica ni contaminante. Éstos pueden ser cualquier adyuvante que esté autorizado para su uso en

5 formulaciones fitorreguladoras, pero preferiblemente se seleccionan de adyuvantes a base de aceite y mezclas, adyuvantes a base de organosilicona y mezclas, adyuvantes de base no iónica y mezclas, adyuvantes de base polimérica y mezclas, y adyuvantes a base de ácidos grasos y mezclas, y combinaciones de los mismos. El adyuvante será cualquiera de los conocidos por el experto medio en la materia y

10 utilizados en el campo técnico de la invención.

En una realización más preferida los adyuvantes se seleccionan de entre cualquiera de los siguientes: araoil, biopower y/o cualquier combinación de los mismos. En otra realización más preferida aún, los adyuvantes se utilizan a las concentraciones

15 determinadas por los fabricantes de los mismos.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a un extracto obtenido a partir de subproductos derivados de la extracción del aceite de oliva y/o de la industria de aderezo de la aceituna, caracterizado por que dicho extracto comprende una

20 concentración de DHFG de al menos 1 ppm, preferentemente de entre 1 a 50000ppm o alternativamente de entre 0.001 a 50 g/L.

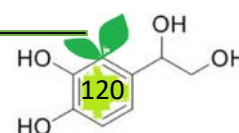
Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a una composición fitorreguladora que comprende DHFG, preferentemente a las concentraciones

25 indicadas anteriormente, y/o un extracto según se ha descrito anteriormente.

En otra realización preferida, la composición fitorreguladora comprende además al menos un adyuvante. En otra realización más preferida, el adyuvante, tal y como se ha indicado anteriormente se selecciona de entre cualquiera de la lista que consiste en:

30 adyuvantes a base de aceite y mezclas, adyuvantes a base de organosilicona y mezclas, adyuvantes de base no iónica y mezclas, adyuvantes de base polimérica y mezclas, y adyuvantes a base de ácidos grasos y mezclas, y combinaciones de los mismos. En otra realización más preferida, el adyuvante se selecciona de entre cualquiera de los siguientes: araoil y/o biopower.

35



WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

7

En otra realización preferida, la composición fitoreguladora de la invención presenta actividad herbicida cuando la concentración de DHFG es de entre 100 a 50000 ppm, preferentemente de entre 500 a 9000 ppm. En otra realización preferida, la composición fitoreguladora de la invención presenta actividad bioestimulante del crecimiento cuando la concentración de DHFG es de 1 a 1500 ppm, preferentemente de entre 1 a 500 ppm.

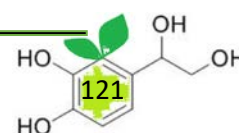
Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a un método para el control de las malas hierbas que comprende administrar a un cultivo una dosis efectiva de DHFG, o del extracto, o de la composición fitoreguladora, según se ha descrito previamente.

A efectos de la presente invención, el término "dosis efectiva", se refiere a una cantidad no tóxica del compuesto DHFG, tal y como se describe en el presente documento, que es suficiente para proporcionar el efecto deseado en los cultivos, por ejemplo, inhibir el crecimiento de malas hierbas o potenciar el crecimiento de los cultivos. La cantidad precisa y eficaz para cada tipo de actividad dependerá del tipo de cultivo, de la extensión a tratar, así como del tipo de administración utilizada. Por lo tanto, no es útil especificar una cantidad exacta efectiva por adelantado. Sin embargo, la cantidad efectiva para una situación dada puede determinarse por la experimentación de rutina y está dentro del criterio del experto medio en la materia.

A efectos de la presente invención, una dosis efectiva, cuando se quiera obtener una actividad herbicida será de alrededor de 100 a 50000 ppm, preferentemente entre 500 a 9000 ppm de DHFG, y una dosis efectiva cuando se quiere obtener una actividad potenciadora del crecimiento, será de alrededor de 1 a 1500 ppm, preferentemente entre 1 a 500 ppm de DHFG.

En una realización preferida, las malas hierbas se seleccionan entre monocotiledóneas y dicotiledóneas. En otra realización más preferida aún, las malas hierbas monocotiledóneas son preferentemente: *Lolium rigidum*; *Lolium multiflorum*, y las malas hierbas dicotiledóneas son preferentemente: *Sinapis arvensis*, *Chenopodium album* y *Stellaria media*.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a un método para inducir el crecimiento de los cultivos que comprende administrar a un cultivo una dosis efectiva





WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

8

del DHFG, o del extracto, o de la composición fitorreguladora, según se ha descrito previamente.

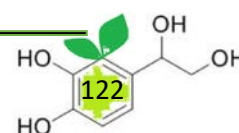
En una realización preferida, los cultivos se seleccionan de entre monocotiledóneas y dicotiledóneas. En otra realización más preferida aún, las monocotiledóneas son preferentemente Gramíneas, más preferentemente *Triticum aestivum* (Trigo blando), Liliáceas, más preferentemente *Allium cepa* (Cebolla var. Galaxia). En otra realización más preferida, las dicotiledóneas son preferentemente Cruciferaes, más preferentemente *Lepidium sativum* L. (Berro de agua); compositaes, más preferentemente *Lactuca sativa* L. (Lechuga var. Cervantes); solanaceaes, más preferentemente *Lycopersicum esculentum* L. (Tomate var. Tres cantos), *Solanum tuberosum* L. (Patata var. Red Repontiac), *Solanum melongena* L. (Berenjena var. Redonda Lisa) y *Capsicum* L. (Pimiento var. Italiano); Cucurbitaceaes, más preferentemente *Cucumis sativus* L. (Pepino var. Bellpuig), *Cucurbita pepo* L. (Calabacín var. Diamante) y *Citrullus lanatus* L. (Sandía var. Meridian); y Asparagaceaes, más preferentemente, *Asparagus officinalis* L. (Espárrago var. Atlas).

En una realización preferida de cualquiera de los métodos descritos en la presente invención, la administración del compuesto DHFG, del extracto y/o de la composición fitosanitaria se administra vía aspersión, atomización, dispersión, recubrimiento, o vertido, dependiendo de los resultados esperados. En otra realización más preferida aún, una vez administrado el compuesto, éste podrá llevar a cabo una liberación rápida o lenta, preferiblemente lenta.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.



WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

9

**Ejemplo 1. Obtención del compuesto DHFG y/o de un extracto rico en el mismo.**

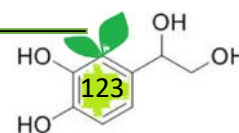
A partir de un subproducto recogido en la industria del aceite de oliva como es el alperujo se genera, tras su almacenamiento, lo que se denominan aguas de alperujo, que fueron usadas en la preparación de extractos y/o concentrados para su caracterización química y fitorreguladora. Estas muestras de agua de alperujo se obtuvieron de cooperativas sitas en Palenciana (Córdoba) y Marchena (Sevilla). Se analizó su contenido fenólico y se determinó que tenía una buena proporción de HT y DHFG, por lo que se puede considerar una fuente a tener en cuenta para la extracción de polifenoles.

El procedimiento de extracción de los polifenoles a nivel industrial se lleva a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la patente EP1369407B1. Dicha extracción se ha llevado a cabo exclusivamente mediante métodos físicos, sin utilización de disolventes orgánicos, por lo que, tanto el extracto como el polifenol descrito en la presente invención, DHFG, son aptos para su uso en cultivos ecológicos. Una descripción breve de la tecnología utilizada para obtener los extractos fenólicos de la presente invención se describe a continuación.

Se partió de un volumen de 100 L de alpechín fresco recogido en la campaña 2013/2014, cuyo contenido en los polifenoles de interés es relativamente alto, con una concentración de HT de 2.45 g/L y de DHFG de 0.27 g/L entre otros, cuantificadas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV). El equipo de extracción está constituido por tres columnas cromatográficas y un equipo de tratamiento de agua con los que se consigue extraer y purificar tres tipos distintos de extractos: un extracto rico en DHFG, otro rico en HT y un tercer extracto que es mezcla de los dos anteriores (HT+DGFG). Se estableció un ciclo de trabajo que comprende varios pasos que se detallan de la siguiente forma:

1. Se carga la primera columna (C.C1) con un volumen fijo de la fuente de fenoles dejándolo caer por gravedad sobre la resina.
2. Tras la carga se procede al lavado con agua de dicha columna previo a la elución.
3. La descarga de la columna se puede realizar en dos pasos, y en cada uno se obtiene un extracto distinto.

3.1. En una primera fase se obtiene una mezcla de HT y DHFG con una relación 10: 1



WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

10

de ambos respectivamente.

3.2. En una segunda fase se recoge un extracto rico en HT.

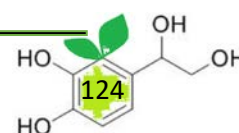
4. Para la purificación y la separación del extracto rico en DHFG se hicieron pasar ciertas fracciones obtenidas anteriormente por una segunda columna cromatográfica (C.C2). Y, tras una serie de eluciones con agua se obtuvieron fracciones que se pudieron concentrar incluso hasta sequedad empleando equipos de concentración o evaporación con o sin vacío. Con ello se obtienen extractos finales con una alta actividad biológica.

- 10 Las fracciones obtenidas de la columna cromatografía C.C2 se purificaron con la ayuda de una tercera columna cromatográfica (C.C3). De este paso se obtuvieron distintas fracciones de las cuales se eligió la más rica en DHFG en función a su perfil cromatográfico, escogiendo aquellas fracciones en donde la señal de DHFG era la mayoritaria (concentraciones de entre 0.001 y 50 g/L), para conseguir los extractos
- 15 finales de este compuesto utilizados en los ejemplos que se describen a continuación. Dichos extractos se prepararán a diferentes pHs y diferentes concentraciones para analizar su efectividad como fitorreguladores.

Una vez obtenidos los tres extractos antes mencionados:

- 20 (1) extracto rico en HT (10-50000 ppm) con varios grados de pureza, 50 y 99,8 % referido a peso seco;
- (2) extracto rico en DHFG (1-50000 ppm) con varios grados de pureza, 50 y 99,6 % referido a peso seco; y
- (3) extracto mezcla que comprende HT + DHFG (en las concentraciones
- 25 anteriores),
- se procedió a analizar la actividad de los mismos. Para ello, se llevaron a cabo ensayos en cámara de crecimiento controlada y en campo utilizando especies de mono y dicotiledóneas para controlar el efecto de dichos compuestos sobre distintas etapas del desarrollo, específicamente en las etapas de pre-emergencia o
- 30 germinación; post-emergencia temprana o desarrollo del estadio de plántula; y post-emergencia tardía o desarrollo de la planta hasta la etapa de producción; de las plantas analizadas.

- Ejemplo 2. Análisis de la actividad fitorreguladora del compuesto DHFG en ensayos de pre-emergencia, tanto en malas hierbas como en cultivos agrícolas.**
- 35



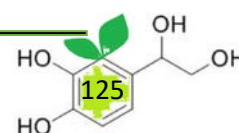
- Placas de Petri de 9 cm de diámetro conteniendo discos de papel de filtro recibieron un volumen de 4 a 8 ml (según la especie de planta ensayada) de una solución conteniendo distintas dosis del compuesto fenólico de interés aislado con un alto grado de pureza, superior al 99%, HT, DHFG y HT+DHFG, que oscilaron entre 0 y 400 ppm
- 5 (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 ppm), y sobre las que finalmente se incorporaron 15 semillas de cada uno de los cultivos y plantas ensayadas. Se hicieron tres repeticiones de cada ensayo y para cada concentración que contenían las 15 semillas cada una para evitar el aglutinamiento en placa y así poder estudiar también la radícula. Como control negativo se utilizaron placas de Petri en las que únicamente
- 10 se añadió agua destilada; y como control positivo se utilizó un herbicida de referencia el Flazasulfuron (FZS) que actúa tanto frente a cultivos de plantas mono y dicotiledóneas, a las mismas dosis utilizadas para cada uno de los compuestos fenólicos (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 ppm).
- 15 Las placas sembradas se incubaron en una cámara de crecimiento controlada (Fitotron; Weiss Technik; Reino Unido) con las siguientes condiciones: temperatura día/noche de 27/18°C; fotoperiodo de 14h; y 580  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de luz; durante un período de 5 a 10 días, según especies. Transcurrido dicho tiempo, se cuentan las semillas que han germinado con éxito y se miden las raíces, para así calcular el índice
- 20 de germinación, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{IG} = [(\% \text{GMxLM})/(\% \text{GCxLC})] \times 100;$$

- dónde: IG = índice de germinación; % GM = porcentaje de semillas germinadas de la muestra (extracto); % GC = porcentaje de semillas germinadas del control negativo
- 25 (agua destilada); LM = longitud media de las raíces de las semillas de la muestra y LC = longitud media de las raíces de las semillas del control negativo.

- Adicionalmente, también se analizaron las variables: número de semillas germinadas,
- 30 longitud de plúmula (donde sea necesario), raíces (longitud y número), peso seco y peso húmedo.

- Las especies de malas hierbas utilizadas en estos ensayos se indican en la Tabla 1, y las especies de cultivos agrícolas ensayadas se indican en la Tabla 2.
- 35



WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

12

**Tabla 1.** Especies de malas hierbas ensayadas.

Monocotiledóneas	Dicotiledóneas
<i>Lolium rigidum</i> (resistencia a inh-EPSPS –R a glifosato–)	<i>Sinapis arvensis</i>
<i>Lolium rigidum</i> (resistencia múltiple a inh- ACCasa y ALS–R a ACCasa y a ALS–)	<i>Chenopodium álbum</i>
<i>Lolium multiflorum</i>	<i>Stellaria media</i>

**Tabla 2.** Especies de cultivos agrícolas ensayadas.

Monocotiledóneas	Dicotiledóneas
Graminaeae: ▪ <i>Triticum aestivum</i> (Trigo blando)	Cruciferae: ▪ <i>Lepidium sativum</i> L. (Berro de agua)
Liliaceae: ▪ <i>Allium cepa</i> (Cebolla var. <i>Galaxia</i> )	Compositae: ▪ <i>Lactuca sativa</i> L. (Lechuga var. <i>Cervantes</i> )
	Solanaceae: ▪ <i>Lycopersicon esculentum</i> L. (Tomate var. <i>Tres cantos</i> ), ▪ <i>Solanum tuberosum</i> L. (Patata var. <i>Red Repontiac</i> ), ▪ <i>Solanum melongena</i> L. (Berenjena var. <i>Redonda Lisa</i> ) ▪ <i>Capsicum</i> L. (Pimiento var. <i>Italiano</i> )
	Cucurbitaceae: ▪ <i>Cucumis sativus</i> L. (Pepino var. <i>Bellpuig</i> ) ▪ <i>Cucurbita pepo</i> L. (Calabacín var. <i>Diamante</i> ) ▪ <i>Citrullus lanatus</i> L. (Sandía var. <i>Meridian</i> )
	Asparagaceae: ▪ <i>Asparagus officinalis</i> L. (Espárrago var. <i>Atlas</i> )



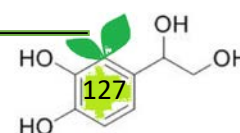
Con los valores obtenidos para cada una de las variables analizadas se han construido curvas de porcentaje de germinación en función de las concentraciones utilizadas de los compuestos HT, DHFG y de la mezcla de ambos. Los resultados obtenidos dan idea de la diferencia de concentraciones que soportan cada una de las especies  
5 ensayadas y de la dosis que en suelo inhiben su germinación.

Los datos que se muestran a continuación recogen los valores necesarios para alcanzar la dosis máxima 90 (LD90) que hace referencia al grado de toxicidad de una sustancia indicando que el 90% de la población tratada con dicha sustancia muere, así  
10 como las dosis de cada extracto que indujo el crecimiento de las plantas.

**Tabla 3.** LD90 y dosis que actúa como activador del crecimiento de las malas hierbas cultivadas en presencia de los diferentes extractos expresados en ppm de ingrediente activo. Valores > implica que no se ha alcanzado el LD90. Cuando aparecen dos dosis  
15 significa que se han obtenido resultados para ambas dosis.

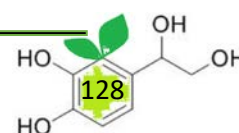
Especies de malas hierbas	LD90			Dosis activadora del crecimiento		
	HT	DHFG	HT+DHFG	HT	DHFG	HT+DHFG
<i>L. rigidum</i> (inh-EPSPS)	350	100, >1000	250		50	
<i>L. rigidum</i> (inh-ACCasa y ALS)	1720	50-100 3420	710			
<i>S. arvensis</i>	350	100	300			
<i>C. álbum</i>	1800	125 >4000	710			

En el caso particular de la mala hierba de la especie *Lolium rigidum* (resistente a  
20 glifosato), se observa una mayor efectividad como antigerminativo o herbicida del DHFG frente al HT y a la mezcla de ambos. La dosis de 100 ppm de DHFG produce una reducción de la germinación de hasta el 90% frente a las dosis necesarias de los otros compuestos ensayados, 350 ppm para el caso del HT y 250 ppm para el caso de la mezcla de HT+DHFG. El hecho de que exista un pico de máxima efectividad a la  
25 dosis de 100 ppm de DHFG, y que a dosis mayores desaparezca esa efectividad,



- apareciendo de nuevo a dosis muy elevadas (>1000 ppm), sugiere un mecanismo de degradación en radicales activos que son los causantes de esos picos. Por otra parte, el incremento de germinación y de masa foliar de dicho cultivo a dosis ligeramente superiores de 100 ppm de DHFG sugiere que dicho compuesto tiene una naturaleza hormonal tal y como ocurre con herbicidas de tipo auxínicos. La acción herbicida del HT solo aparece a dosis relativamente altas del compuesto. La mezcla HT+DHFG presenta un incremento de masa foliar a 50 ppm lo que implica que hay carácter hormonal de crecimiento.
- 10 En los ensayos llevados a cabo para la especie *Lolium rigidum* (R a ACCasa y a ALS) se demostró que una dosis de DHFG de 3420 ppm fue capaz de reducir la germinación de dicha especie en un 90%, mientras que las LD90 para HT y para la mezcla de HT+DHFG fueron de 1720 ppm y 710 ppm, respectivamente. Todas las dosis de los compuestos a las que se obtuvo la LD90 son muy altas y no son útiles
- 15 para el control del crecimiento de dicha mala hierba. Sin embargo, se observó que a la dosis de 1320 ppm de DHFG se produjo una reducción del peso del 90%. Otro aspecto curioso es que se vuelve a repetir el efecto inhibitorio del crecimiento a dosis bajas de 50-100 ppm de DHFG. Estos resultados ponen de manifiesto que aunque el DHFG controla el crecimiento de la planta *Lolium rigidum* (resistente a ACCasa y a
- 20 ALS), dicho control no es tan efectivo como el llevado a cabo en el caso de la planta *Lolium rigidum* (resistente a glifosato).

- En el caso de la especie *Sinapis arvensis*, ésta tuvo problemas de germinación por lo que se procedió a utilizar el ensayo topográfico de tetrazolio (Moore R.P. *Int Seed Testing Ass Proc.* 1969; 34:233). En dicho método se tiñen de rojo las células vivas mediante la reducción de una sal de tetrazolio, que es incolora, para formar un formazán rojo. Se hace hincapié en la necesidad de conocer la viabilidad de las distintas partes del embrión para predecir el desarrollo de embriones y su conversión en gérmenes que se puedan contar (Moore R.P. *Viability of sedes.* 1973:94-113). En el
- 25
- 30 caso de *S. arvensis*, tal y como se observa en la Tabla 3, aparentemente parece resistir dosis mayores de los compuestos. Sin embargo, el DHFG presenta el mismo patrón de actuación que en la monocotiledónea anteriormente estudiada (*L. rigidum*). Cuando se cultivó esta planta en presencia de cada uno de los compuestos estudiados, se observó que los hongos proliferaban en mayor medida en presencia de



HT y en menor medida con la mezcla HT+DHFG, poniendo de manifiesto que el HT induce el crecimiento de hongos.

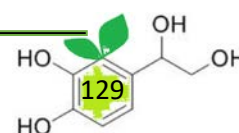
En el caso de la especie *C. álbum*, tal y como se observa en la Tabla 3, la mezcla de HT+DHFG es más efectiva como herbicida frente a dicha especie que cualquier otro compuesto, ya que la mezcla es capaz de reducir en un 90% la germinación de *C. álbum* a una menor dosis (710 ppm), que la utilizada en el caso de DHFG (>4000 ppm) o HT (1800 ppm). Aunque sí es cierto que a la dosis de 125 ppm de DHFG se produce una considerable reducción de la germinación seguida de una disminución en las variables a estudiar. Sin embargo, a dicha dosis de 125 ppm de DHFG no se alcanza la dosis letal LD90, la cual asegura un control seguro de la especie.

Cuando dichos cultivos de malas hierbas fueron tratados con las diferentes dosis del herbicida flazasulfuron (las mismas que los compuestos fenólicos estudiados, tal y como se ha indicado anteriormente) se demostró que dicho compuesto es muy efectivo en el tratamiento de las malas hierbas, tanto para mono como dicotiledóneas, obteniéndose un LD90 de 90 ppm con dicho herbicida.

Por lo tanto, estos resultados ponen de manifiesto que el uso de DHFG muestra actividad herbicida siendo capaz de controlar el crecimiento de las malas hierbas *L. rigidum* (inh- EPSPS), *L. rigidum* (inh- ACCasa y ALS), *S. arvensis* y *C. álbum*, cuando se usaron a dosis similares a las empleadas con el herbicida flazasulfuron.

Posteriormente se llevó a cabo el mismo ensayo pero en cultivos de interés agrícola. En la Tabla 4 se muestran los valores de concentración expresados en ppm de cada uno de los compuestos analizados para alcanzar la LD90, así como las dosis de cada extracto que indujeron el crecimiento de los cultivos de interés agrícola.

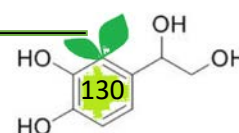
**Tabla 4.** LD90 y dosis que actúa como activador del crecimiento de las diferentes especies de interés agronómico ensayadas con los diferentes compuestos expresados en ppm de ingrediente activo. Valores > implica que no se ha alcanzado el LD90.





Especies	LD90			Dosis activadora del crecimiento (ppm)		
	HT	DHFG	HT+DHFG	HT	DHFG	HT+DHFG
<i>L. sativa</i> L.	7500	>4000	3000		100	
<i>L. esculentum</i> L.	460	3560	460			
<i>S. tuberosum</i> L.	1790	>4000	>12000		200	
<i>S. melongena</i> L.	1290	3890	780			
<i>Capsicum</i> L.	1420	978	970			
<i>C. sativus</i> L.	3700	>4000	1760			
<i>C. pepo</i> L.	6790	>4000	1720			
<i>C. lanatus</i> L.	480	1970	490			
<i>A. officinalis</i> L.	7860	>4000	375			
<i>A. cepa</i>	1375	>4000	495			
<i>T. aestivum</i>	750	>4000	3000	100	500	100

- Los resultados mostrados para la especie *Triticum aestivum* frente a las diferentes dosis de los compuestos ensayados pusieron de manifiesto que el HT afecta a la germinación de dicha especie desde la dosis 500 ppm, pero se comporta como un compuesto "sucio" ya que aumenta el desarrollo de hongos en las semillas y por tanto induce contaminación del cultivo. La dosis de HT que reduce tanto la germinación, como el peso, el número de raíces, la longitud de raíces y la longitud de la plúmula en un 90% (LD90) equivale a 750 ppm. Por el contrario, cuando se trataron los cultivos de *T. aestivum* con la mezcla HT+DHFG, la LD90 fue de 3000 ppm. Dicha dosis afectó en todos los sentidos a las semillas ya germinadas. Esta mezcla actúa como un potenciador de la germinación, el peso, la generación de raíces, la longitud de estas y de la plúmula a una dosis de 100 ppm. Para el caso de los cultivos de *T. aestivum* tratados con las diferentes dosis de DHFG se observó que la acción antigerminativa en esta especie apenas alcanza un 50%, lo que supone un dato importante para ser utilizado en el control de las malas hierbas *Lolium spp.* sobre cultivos de trigo. Sorprendentemente, se observa un incremento de la germinación a dosis de 500 ppm, al igual que en el peso fresco, funcionando dicho compuestos como un potenciador de crecimiento y germinación en estos cultivos. La producción de raíces se produce a dosis menores (125 ppm) y el incremento en la longitud de la misma a dosis incluso menores (100 ppm). Para el desarrollo de la plúmula basta con 75 ppm para aumentar considerablemente su longitud.

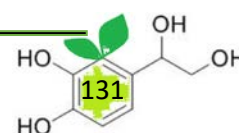


Los resultados resumidos en la Tabla 4 para la especie *Lactuca sativa* L. (lechuga var. Cervantes) tratada con las diferentes concentraciones ensayadas de HT, DHFG o HT+DHFG, han puesto de manifiesto que a partir de 4000 ppm de DHFG comienza a afectarse el peso, la longitud de la raíz y de los cotiledones de dichos cultivos. Sin embargo, no se consigue alcanzar el LD90 de la germinación. A una dosis de 100 ppm de DHFG se observa un incremento en el peso fresco respecto al control. El tratamiento con HT en dicha especie indujo una contaminación fúngica debida al extracto y la dosis que afectó tanto a la germinación como al peso, desarrollo de raíces y cotiledones, fue de aproximadamente unos 7500 ppm, siendo una dosis muy elevada. Por otro lado, el tratamiento con la mezcla HT+DHFG puso de manifiesto que el LD90 se obtuvo a la dosis de 2980 ppm y la dosis a la que empezó a observarse una disminución acusada en el peso fresco, raíces y longitud de los cotiledones fue de 300 ppm.

Para los cultivos de la especie *Solanum tuberosum* L. (patata var. Red Repontiac) las diferentes dosis de DHFG no afectaron a la germinación (LD90 > 4000 ppm). Sin embargo, se observa un incremento en el aumento del peso de la raíz formada a una dosis de 200 ppm. El tratamiento con HT a diferentes concentraciones puso de manifiesto que la dosis LD90 se obtuvo a 1790 ppm. Dicha dosis afecta también al peso fresco de la raíz formada en la etapa de germinación y también se observa que a dosis altas de HT se produce la putrefacción de las mismas. El tratamiento de dichos cultivos con la mezcla HT+DHFG a diferentes dosis demostró que la LD90 > 12000 ppm, pero a partir de una dosis de 3000 ppm el efecto en la germinación es acusado. Sin embargo, se observa que existe un aumento del peso de la raíz en las que han germinado.

Como se observa en la Tabla 4, el comportamiento de la especie *A. cepa* (cebolla var. Galaxia) frente a diferentes dosis de DHFG puso de manifiesto una disminución brusca del porcentaje de germinación a dosis muy bajas, entre 25 y 50 ppm. Sin embargo, la LD90 para este cultivo se obtuvo a dosis mucho mayores 4000 ppm. Cuando dichos cultivos se trataron con diferentes dosis de HT o HT+DHFG, se obtuvo un LD90 a la dosis de 1375 ppm y 495 ppm, respectivamente.

La especie *Lepidium sativum* L. (berro de agua) es una especie que se usa como indicador de productos que pueden presentar fitotoxicidad ya que es extremadamente

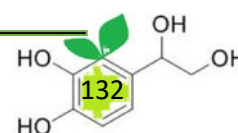


sensible. Los compuestos analizados en la presente invención demostraron ser fitotóxicos incluso a pequeñas dosis. Específicamente, el tratamiento con DHFG indujo una disminución brusca de la germinación de dicha planta a dosis de entre 25 y 50 ppm. Sin embargo, la LD90 para este cultivo se encuentra a dosis mayores de 4000 ppm.

*Asparagus officinalis* L. (Espárrago var. Atlas) no germinó bien en los experimentos por lo que se procedió a utilizar el método topográfico de tetrazolio para determinar las semillas vivas. Los LD90 obtenidos en este ensayo son de 7860, >4000, 375 ppm para el HT, DHFG y HT+DHFG, respectivamente.

De manera general, los resultados mostrados en la Tabla 4 ponen de manifiesto que el tratamiento con DHFG a dosis bajas es efectivo contra la germinación de las malas hierbas, mientras que para generar efectos tóxicos en las diferentes especies de interés agrícola ensayadas es el compuesto que necesita una mayor concentración. Bien es cierto que el tratamiento con DHFG muestra un efecto favorecedor de la germinación cuando se usa a bajas concentraciones para los cultivos de *L. sativa* L. (lechuga), *S. tuberosum* L (patata) y *T. aestivum* (trigo). Así, el DHFG es útil como fitorregulador, siendo capaz de presentar actividad herbicida frente a malas hierbas y actividad potenciadora del crecimiento en cultivos de interés agrícola. En este sentido y como se ha comentado anteriormente, para el caso particular de los cultivos de *T. aestivum*, la acción antigerminativa de este compuesto en esta especie apenas alcanza un 50%, lo que supone un dato importante para ser utilizado en el control de *Lolium* spp. sobre cultivos de trigo. Curiosamente, en dichos cultivos de *T. aestivum* se observa que el tratamiento con DHFG a la dosis de 500 ppm induce un incremento de la germinación de dichos cultivos, al igual que un incremento en el peso fresco de dichos cultivos, funcionando así el DHFG como un potenciador del crecimiento y la germinación en estos cultivos. Respecto al resto de las variables analizadas, es interesante mencionar que la producción de raíces se produce con dosis bajas de DHFG (125 ppm) y el incremento en la longitud de las mismas a dosis incluso menores, 100 ppm. Para el desarrollo de la plúmula bastó con 75 ppm de DHFG para aumentar considerablemente su longitud.

Como se puede observar en la Tabla 4, el tratamiento de las semillas con HT a las diferentes dosis ensayadas fue capaz de controlar el crecimiento de las malas hierbas,



WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

19

pero presenta el inconveniente de producir hongos y acabar contaminando las semillas. Para el caso de la mezcla HT+DHFG, se observa en los datos mostrados en la Tabla 4 que hay dosis que inducen la germinación de cultivos pero a su vez también potencian el crecimiento de las malas hierbas, por lo tanto no es un tratamiento válido ni efectivo.

Los resultados obtenidos para los controles positivos (cultivos tratados con el herbicida FZS pusieron de manifiesto que las LD90 para diferentes especies estaban en dosis muy bajas del mismo, aproximadamente 90 ppm, dejando así constancia de la efectividad de dicho herbicida tanto para cultivos de mono como dicotiledóneas.

Por lo tanto, el HT es capaz de controlar el crecimiento de malas hierbas, pero presenta el inconveniente de producir hongos y acabar contaminando las semillas. La mezcla de HT+DHFG también presenta problemas ya que las dosis utilizadas para controlar el crecimiento de las malas hierbas están en el límite con las dosis que impiden el crecimiento de los cultivos, por lo que tampoco es un candidato útil como fitorregulador. En cambio, los resultados han demostrado que el DHFG es el candidato principal para actuar como fitorregulador, siendo eficaz como herbicida, ya que además de presentar grandes diferencias entre las malas hierbas y los cultivos, presenta ventajas a dosis bajas como activador de la germinación y del crecimiento.

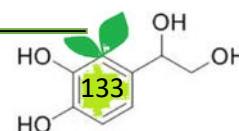
**Ejemplo 3. Análisis de la actividad fitorreguladora del compuesto DHFG en ensayos de post-emergencia temprana, tanto en malas hierbas como en cultivos agrícolas.**

Plantas en el primer estadio de desarrollo de crecimiento se plantaron en alveolos de 25 cm<sup>3</sup> con un sustrato constituido por una mezcla limo:turba (relación 1:1) y se trataron con HT, DHFG o HT + DHFG a diferentes dosis. Las especies de malas hierbas y cultivos agrícolas ensayados son las descritas en las tablas Tabla 5 y Tabla 6, respectivamente. Las dosis ensayadas para cada uno de los tratamientos han sido:

HT: 400, 800, 1600, 3200 y 6400 g ingrediente activo/ha

DHFG: 40, 80, 400, 800 y 1600 g ingrediente activo/ha

HT+DHFG: 400, 800, 1600, 3200 y 4800 g ingrediente activo/ha (referidos al componente HT-proporción HT:DHFG es 1:10).



WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

20

Como control negativo se utilizaron todos los cultivos de estudio a los que no se les aplicó ningún tratamiento. Para el caso de analizar la actividad herbicida en malas hierbas (todas las especies serán usadas) se utilizará como control positivo el herbicida flazasulfuron a las mismas dosis que los compuestos testados.

5

Tras la aplicación de cada uno de los tratamientos a testar, los alveolos fueron introducidos en una cámara de crecimiento controlado (Fitotron; Weiss Technik; Reino Unido) con las siguientes condiciones: temperatura día/noche de 27/18°C; fotoperiodo de 14 h; y luz  $580 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , durante un período de entre 20 días, momento en el que se cortó la vegetación e inmediatamente después se pesó y se construyeron curvas de disminución de peso fresco en función de las concentraciones de cada uno de los extractos ensayados y de las especies testadas. Se utilizaron 10 plantas como repeticiones por tratamiento y especie).

10

Cada uno de los tratamientos mencionados anteriormente se aplicaron vía aspersión foliar en el caso de los cultivos de malas hierbas, ya que es el modo habitual de aplicación para este tipo de vegetación, mientras que para el caso de las especies de interés agrícola, cada uno de los tratamientos testados se aplicaron también por lavado directamente en tallo para corroborar si existían diferencias entre ambos tipos de aplicación sobre el resultado final. Cualquiera de las aplicaciones conocidas por el experto en la materia puede ser utilizada para los compuestos de la presente invención. En el caso de la aspersión foliar se preparó un volumen de caldo de 400L/ha, mientras que para lavado fue de 10000 L/ha.

20

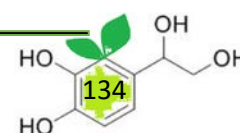
**Tabla 5.** Especies de malas hierbas ensayadas.

Monocotiledóneas	Dicotiledóneas
<i>Lolium spp.</i> (aspersión foliar)	<i>Conyza spp.</i> (aspersión foliar)

25

**Tabla 6.** Especies de cultivos agrícolas ensayadas.

Monocotiledóneas	Dicotiledóneas
<b>Graminaeae:</b> ▪ <i>Triticum aestivum</i> (Trigo blando) [Aspersión foliar]	<b>Compositae:</b> ▪ <i>Lactuca sativa</i> L. (Lechuga var. Cervantes) [Aspersión foliar]
<b>Liliaceae:</b> ▪ <i>Allium cepa</i> (Cebolla var. Galaxia)	<b>Solanaceae:</b> ▪ <i>Lycopersicum esculentum</i> L. (Tomate var.





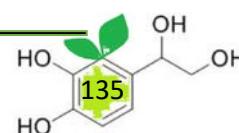
WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

21

[Aspersión foliar y lavado directo]	<i>Tres cantos</i> ) [Aspersión foliar y lavado directo] ▪ <i>Solanum tuberosum</i> L. ( <i>Patata</i> var. <i>Red Repontiac</i> ) [Aspersión foliar] ▪ <i>Solanum melongena</i> L. ( <i>Berenjena</i> var. <i>Redonda Lisa</i> ) [Aspersión foliar y lavado directo] ▪ <i>Capsicum</i> L. ( <i>Pimiento</i> var. <i>Italiano</i> ) [Aspersión foliar y lavado directo]
	<i>Cucurbitaceae</i> : ▪ <i>Cucumis sativus</i> L. (Pepino var. Bellpuig) [Aspersión foliar y lavado directo] ▪ <i>Cucurbita pepo</i> L. (Calabacín var. Diamante) [Aspersión foliar y lavado directo] ▪ <i>Citrullus lanatus</i> L. (Sandía var. Meridian) [Aspersión foliar y lavado directo]
	<i>Asparagaceae</i> : ▪ <i>Asparagus officinalis</i> L. (Espárrago var. Atlas) [Aspersión foliar]

- Los resultados obtenidos para el control de las malas hierbas utilizando las diferentes concentraciones mencionadas anteriormente de HT, DHFG o HT+DHFG sobre la especie *Lolium spp* mediante aplicación vía foliar puso de manifiesto que
- 5 exclusivamente el tratamiento con DHFG fue capaz de controlar el crecimiento de dicha mala hierba. La dosis eficaz ED90 para esta especie cuando se trató con dicho extracto fue de 575 g ingrediente activo/ha, y la dosis de 1600 ppm consiguió un control absoluto de su crecimiento, mientras que la dosis ED90 para HT y HT+DHFG fue de >3200 g ingrediente activo/ha y > 4800 g ingrediente activo/ha,
- 10 respectivamente, por lo que dichos tratamientos no fueron capaces de controlar el crecimiento de esta mala hierba (Tabla 7). En el caso de los cultivos de la especie *Conyza spp* tratada con las diferentes concentraciones mencionadas anteriormente de HT, DHFG o HT+DHFG, se obtuvieron los mismos resultados que para la especie *Lolium spp*. Exclusivamente, el tratamiento con DHFG fue capaz de controlar el
- 15 crecimiento de dicha mala hierba. La ED90 para esta especie cuando se trató con



WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

22

DHFG está en 580 g ingrediente activo/hectárea (Tabla 7). El control absoluto del crecimiento se produjo a 800 g ingrediente activo/hectárea.

- Tabla 7.** LD90 y dosis que actúa como activador del crecimiento de las diferentes especies con los diferentes compuestos (expresados en gramos de ingrediente activo/ha).

Especies	LD90			Dosis activadora del crecimiento		
	HT	DHFG	HT+DHFG	HT	DHFG	HT+DHFG
<i>Lolium spp.</i>	>3200	575	>4800			
<i>Conyza spp.</i>	>3200	580	>4800			
<i>L. sativa L.</i>	>6800	>1600	>4800			
<i>L. esculentum L.</i>	>6800	>1600	>4800			
<i>S. tuberosum L.</i>	1920	>1600	>4800		400	
<i>S. melongena L.</i>	>6800	>1600	4800			
<i>Capsicum L.</i>	>6800	>1600	>4800			
<i>C. sativus L.</i>	>6800	1600	4800			
<i>C. pepo L.</i>	>6800	>1600	2800			
<i>C. lanatus L.</i>	>6800	>1600	4800			
<i>A. officinalis L.</i>	>6800	>1600	>4800			
<i>A. cepa</i>	>6800	>1600	>4800			
<i>T. aestivum</i>	1520	>1600	>4800		400	

- Tal y como se observa en la Tabla 7, para el caso de los cultivos de interés agrícola, es interesante destacar que ninguna de las dosis de los compuestos utilizadas provocaron fitotoxicidad en los cultivos testados. Por otro lado, es interesante destacar que el tratamiento con DHFG indujo un aumento de peso y vigor en los cultivos de *T. aestivum* y *S. tuberosum* a dosis superiores a 400 g ingrediente activo/ha.

- Así, los resultados mostrados en la Tabla 7 ponen de manifiesto que los cultivos mostraban vigor y buen desarrollo frente a las diferentes dosis de los distintos compuestos. Se observaron efectos negativos en alguno de los cultivos. El compuesto que más efecto negativo mostró fue la mezcla HT+DHFG, aunque viendo la dosis no es tan importante como el ocasionado por el DHFG en el pepino. Hay que tener en cuenta que el HT en aspersión foliar produce unas manchas en las hojas de las

WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

23

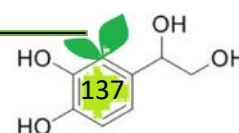
plantas que parecen ser hongos. El aspecto más importante a destacar de los resultados mostrados en la Tabla 7 es que el DHFG tiene actividad potenciadora del crecimiento, que se puede observar muy bien en los cultivos de *S. melongena* L. (berenjena). Las dosis soportadas en plantas con dos a cuatro hojas verdaderas son muy elevadas debido a que la planta ya ha desarrollado mecanismos que le permiten resistir a dosis mayores.

**Ejemplo 4. Análisis de la actividad fitorreguladora del compuesto DHFG en ensayos de post-emergencia tardía, tanto en malas hierbas como en cultivos agrícolas.**

Aunque en el ejemplo anterior ha quedado demostrado que el efecto del tratamiento con el compuesto DHFG es menor sobre la inducción del crecimiento y germinación en las plantas ya desarrolladas, es conocido que dichas plantas en condiciones de estrés son más susceptibles a ciertos tratamientos. Por ello, se ha procedido a analizar la actividad del compuesto DHFG cuando se administra en los cultivos de: *Lycopersicum esculentum* L. (tomate); *Allium cepa* (cebolla); *Capsicum* L. (pimiento); *Cucurbita pepo* L. (calabacín); *Lactuca sativa* L. (lechuga); *Solanum melongena* L. (berenjena) y *Asparagus officinalis* L. (espárrago), cuando dichos cultivos estaban en estadio de post-emergencia tardía y además en condiciones de estrés abiótico (ausencia de riego provocado por 2 días sin riego-1 riego-3 días sin riego-1 riego). La aplicación de HT, DHFG y HT+DHFG se ha realizado por aspersión en todos los casos.

**Tabla 8.** LD90 de las diferentes especies con los diferentes compuestos (expresados en gramos de ingrediente activo/ha).

Especies	LD90		
	HT	DHFG	HT+DHFG
<i>L. sativa</i> L.	>6800	>1600	>4800
<i>L. esculentum</i> L.	>6800	>1600	>4800
<i>S. melongena</i> L.	>6800	>1600	4800
<i>Capsicum</i> L.	>6800	>1600	>4800
<i>C. pepo</i> L.	>6800	>1600	2800
<i>A. officinalis</i> L.	>6800	>1600	>4800
<i>A. cepa</i>	>6800	>1600	>4800





WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

24

Los cultivos presentan una respuesta positiva a las diferentes dosis de los diferentes compuestos sin importar si existen zonas foliares afectadas o no. Esto indica que el daño es mínimo ya que se observa una rápida recuperación de las mismas seguida de una mejora en su desarrollo foliar.

5

Los resultados mostrados en la Tabla 8 ponen de manifiesto que las especies analizadas a estadios muy altos de desarrollo, no son susceptibles a los compuestos ensayados, ni siquiera a dosis muy altas.

10 **Ejemplo 5. Análisis de la actividad herbicida del compuesto DHFG en estadios de pre-emergencia en campo.**

El análisis de la actividad herbicida del compuesto DHFG en estadios de pre-emergencia (germinación) en campo se realizó en parcelas de cultivo hortícola en la localidat de Huétor-Tajar (Granada, España). Se ensayaron el DHFG y la mezcla HT+DHFG que mostraron actividad herbicida en los ejemplos anteriores de pre-emergencia. La aplicación de dichos compuestos se realizó vía foliar por aspersión utilizando un volumen de caldo de 400 L/ha, y las dosis utilizadas han sido:

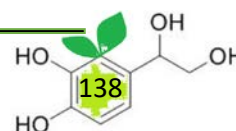
- DHFG: 40, 400 y 800 g de ingrediente activo/ha
- 20 – HT+DHFG: 400, 800 y 1600 g de ingrediente activo/ha.

Como control positivo se ha utilizado el herbicida Flazasulfuron a las dosis de 100, 200 y 1000 g/ha.

25 Además del tratamiento exclusivo con cada uno de los compuestos ensayados, se analizó la actividad herbicida adicionando a cada uno de ellos un adyuvante. Los adyuvantes elegidos han sido Araoil (aceite de parafina, Fitalbi, España) que es un concentrado emulsionable con actividad insecticida por contacto para el control de plagas) y Biopower (alquiletersulfato, Bayer, Alemania) que es un coadyuvante tensoactivo (mojante no iónico) que se recomienda para aumentar la eficacia de los herbicidas que se aplican por contacto para mejorar el poder mojante.

Se han hecho 4 repeticiones de cada tratamiento en parcelas de 2x10 m<sup>2</sup>. Los resultados ponen de manifiesto que el herbicida comercial Flazasulfuron es el más efectivo. En cambio, el DHFG y la mezcla HT+DHFG sin la presencia de los aditivos,

35



WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

25

potencian el crecimiento. Cuando a dichos extractos independientemente se les añaden cada uno de los aditivos ensayados, la eficacia herbicida de dichas composiciones aumenta considerablemente, principalmente cuando la composición comprende el adyuvante Biopower, con lo cual también se espera que la mezcla de los dos con el adyuvante también mejore.

Ensayos adicionales, que se muestran en los ejemplos 7 y 8, se llevaron a cabo para determinar la acción de los adyuvantes sobre la penetrabilidad foliar de los compuestos y sobre la estabilización en suelo de los mismos.

10

**Ejemplo 6. Análisis de la absorción foliar y estabilidad del compuesto DHFG y de la mezcla (DHFG+HT) en plantas de pimiento.**

Con el fin de analizar la cantidad de DHFG y HT+DHFG que las hojas de una planta son capaces de absorber, así como de la estabilidad de dichos extractos tras su absorción, se ensayaron dichas variables en hojas de plantas de pimiento. Brevemente, se trasplantan 18 plántulas de *Capsicum* L. (pimiento var. Italiano) a macetas con turba, se riegan y se dejan crecer durante 5 días. De cada maceta se eligieron y se marcaron dos hojas para realizar el ensayo por duplicado.

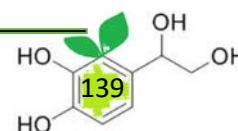
20

Partiendo de DHFG (3.5 g/L) se prepararon tres disoluciones de 1000, 500 y 100 ppm de DHFG. De la misma manera, se procedió con la mezcla DHFG + HT cuyas concentraciones fueron de 1.2 y 13.6 g/L, respectivamente. Las disoluciones de la mezcla fueron también de 1000, 500 y 100 ppm de DHFG con respecto al HT. Se eligieron estas concentraciones en función de la estabilidad que presentaron las plantas frente a estas concentraciones en los ejemplos anteriores. Además, también se aplicaron a cada uno de los compuestos ensayados los adyuvantes Araoil (aceite de parafina que se aplica sobre el extracto al 0.5 %) o Biopower (alquiletersulfato que se aplica sobre el extracto al 1 %).

30

Una vez transcurridos los 5 días y alcanzado el tamaño deseado de cada planta se comienza el ensayo aplicando 0.1 mL de cada compuesto con una jeringa para cada concentración y cada coadyuvante, sobre las hojas de cada planta por duplicado. Una vez aplicados los distintos compuestos con los respectivos coadyuvantes se deja secar por dos horas y se procede a lavar las hojas de cada maceta con 10 mL de

35

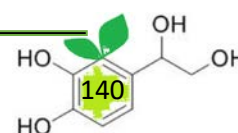


metanol/agua al 50 % con el fin de arrastrar la cantidad de compuesto que la planta no ha absorbido. Se recoge el lavado en placas de Petri y se determina su concentración en HPLC.

- 5 En la Tabla 9 se muestran los resultados en forma de porcentaje de ingrediente activo (DHFG) absorbido por hoja tratada y obtenidos mediante HPLC y fluorescencia.

**Tabla 9.** Porcentaje de 3,4 DHFG absorbido por hoja tratada.

Tratamiento	DHFG añadido (mg)	DHFG extraído (mg)	% ingrediente activo absorbido
DHFG 1000 ppm (1)	0,1	0,0984	1,60
DHFG 1000 ppm (2)	0,1	0,0785	21,44
DHFG 1000 ppm + Bio (1)	0,1	0,0513	48,68
DHFG 1000 ppm + Bio (2)	0,1	0,0917	8,24
DHFG 1000 ppm+Ara (1)	0,1	0,0510	48,97
DHFG 1000 ppm+Ara (2)	0,1	0,0381	61,90
HT+DHFG 1000 ppm (1)	0,1	0,0110	8,89
HT+DHFG 1000 ppm (1)	0,1	0,0115	8,85
HT+DHFG 1000 ppm +Bio (1)	0,1	0,0058	9,42
HT+DHFG 1000 ppm + Bio (2)	0,1	0,0059	9,41
HT+DHFG 1000 ppm +Ara (1)	0,1	0,0082	9,17
HT+DHFG 1000 ppm + Ara (2)	0,1	0,0081	9,18
DHFG 500 ppm (1)	0,05	0,0065	86,88
DHFG 500 ppm (2)	0,05	0,0108	78,33
DHFG 500 ppm + Bio (1)	0,05	0,0019	96,02
DHFG 500 ppm + Bio (2)	0,05	0,0034	93,14
DHFG 500 ppm+Ara (1)	0,05	0,0113	77,28
DHFG 500 ppm+Ara (2)	0,05	0,0148	70,32
HT+DHFG 500 ppm (1)	0,05	0,0030	9,39
HT+DHFG 500 ppm (1)	0,05	0,0026	9,47
HT+DHFG 500 ppm +Bio (1)	0,05	0,0019	9,60
HT+DHFG 500 ppm + Bio (2)	0,05	0,0019	9,62
HT+DHFG 500 ppm +Ara (1)	0,05	0,0032	9,34
HT+DHFG 500 ppm + Ara (2)	0,05	0,0037	9,26



Tratamiento	DHFG añadido (mg)	DHFG extraído (mg)	% ingrediente activo absorbido
DHFG 100 ppm (1)	0,01	0,0015	84,46
DHFG 100 ppm (2)	0,01	0,0004	95,57
DHFG 100 ppm + Bio (1)	0,01	0,0003	96,29
DHFG 100 ppm + Bio (2)	0,01	0,0004	95,83
DHFG 100 ppm+Ara (1)	0,01	0,0015	84,18
DHFG 100 ppm+Ara (2)	0,01	0,0014	85,15
HT+DHFG 100 ppm (1)	0,01	0,00003	9,96
HT+DHFG 100 ppm (2)	0,01	0,00003	9,97
HT+DHFG 100 ppm +Bio (1)	0,01	0,00003	9,96
HT+DHFG 100 ppm + Bio (2)	0,01	0,00003	9,96
HT+DHFG 100 ppm +Ara (1)	0,01	0,00041	9,58
HT+DHFG 100 ppm + Ara (2)	0,01	0,00046	9,53

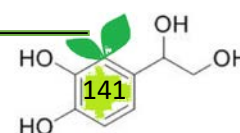
En la Tabla 9 se observa claramente cómo a la concentración de 1000 ppm de DHFG la absorción es mucho menor en todos los casos comparado con las concentraciones de 500 y 100 ppm. En el caso de la mezcla HT+DHFG, el porcentaje de absorción se mantiene en todos los casos sobre el 10%, independientemente de la concentración inicial de cada ingrediente activo, poniendo de manifiesto que se absorbe más cantidad por parte de las hojas cuando se utiliza la mezcla HT+DHFG, que cuando se utiliza el DHFG sólo. También es llamativa la variabilidad entre las muestras, y la elevada absorción del DHFG cuando se utilizan a concentraciones de 500 ppm y 100 ppm, tanto de forma directa, como en combinación con los adyuvantes Biopower o Araoil. A pesar de ello se ve que el uso de adyuvantes no mejora llamativamente la absorción del DHFG, el cual se absorbe por encima del 80 % en concentraciones de 100 y 500 ppm.

15

#### **Ejemplo 7. Análisis de la estabilidad del compuesto DHFG en cultivos de trigo durante su germinación.**

El objetivo de este ensayo es determinar la estabilidad de un extracto de DHFG de 5 g/L diluido a diferentes concentraciones (50, 100, 200, 500, 1000 y 2000 ppm) durante el proceso de germinación de semillas de *Triticum durum* (Trigo duro). Dichas semillas

20



WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

28

fueron facilitadas por el Departamento de Química Agrícola y Edafología de la Universidad de Córdoba. Se sumergen en una disolución de hipoclorito sódico al 1 % durante 10 segundos para romper la cáscara y facilitar la germinación, a continuación se enjuagan con agua destilada y se dejan secar. Una vez secas, se preparan siete

5 placas de Petri estériles con sendos discos de papel de filtro y se colocan 15 semillas de trigo en cada una de ellas. Seguidamente, se añaden 5 mL de las distintas concentraciones de DHFG indicadas anteriormente y un blanco con agua destilada. Las placas de Petri se sellan con parafilm y se dejan 48 h a 4 °C en oscuridad. Trascurrido dicho tiempo se sacan de la cámara fría y se dejan germinar 3 días más,

10 evitando la incidencia de rayos solares de forma directa. Pasados 5 días desde el inicio del ensayo se toman muestras del sobrenadante y se determina la concentración de DHFG en cada placa utilizando HPLC-UV a 280 nm. Los perfiles cromatográficos (HPLC) obtenidos ponen de manifiesto que no se forman otros compuestos por degradación u oxidación del DHFG y que éste se mantiene, verificando la estabilidad

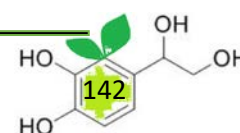
15 del compuesto DHFG en la semilla sin ningún tipo de adyuvante. A continuación en la Tabla 10 se muestra la concentración del compuesto DHFG extraído de cada una de las placas de germinación ensayadas.

20 **Tabla 10.** Concentración de DHFG extraído de cada placa de germinación de cultivos de *T. durum*.

[DHFG] inicial (mg/mL)	[DHFG] final (mg/mL)	% extraído
0	0	0
50	94,78	189,50
100	143,22	143,22
200	198,02	99,01
500	399,06	79,81
1000	977,82	97,80
2000	1913,33	95,70

En la Tabla 10 se puede observar que después de 5 días la mayor parte del DHFG permanece como tal en contacto con la semilla. Cabe destacar que en dos de las concentraciones se ha obtenido un dato por encima del valor inicial, como el de 50 y

25 100 ppm, lo cual pueda deberse a que la disolución que impregna la placa se haya podido concentrar o que parte de ese compuesto sea incluso endógeno de la planta.





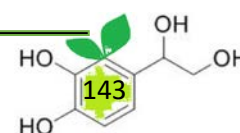
### Ejemplo 8. Efecto de la radiación solar sobre muestras de tierra impregnadas con DHFG.

Con el fin de determinar la influencia de la radiación solar sobre el DHFG una vez  
 5 impregnados en la tierra de cultivo, se tomaron muestras de tierras sin tratar de las  
 parcelas donde se desarrollaron los estudios de campo en Huetor-Tájar (Granada) y  
 se extendieron en bandejas de 0.53 x 0.38 m equivalentes a 0.2 m<sup>2</sup> de superficie.  
 Partiendo del extracto con concentración 3.5 g/L de DHFG, se prepararon disoluciones  
 de 1000, 500 y 100 ppm, y se pulverizaron 25 mL de cada disolución sobre las  
 10 bandejas. Dicho volumen se determinó sabiendo que en campo, al menos, se ha  
 empleado 400 L de caldo por hectárea. De esta manera se prepararon tres bandejas,  
 una para cada concentración de extracto, divididas en dos partes bien diferenciadas,  
 una de ellas expuesta a la radiación solar y la otra resguardada de dicha radiación al  
 cubrirse con papel de aluminio, totalmente opaco a la radiación. Se hizo una toma de  
 15 muestra a tiempo cero y dos más cada 24 h. Para cada muestra se pesaron 10g de  
 tierra y se extractaron en frío con 10 mL de una mezcla metanol/agua (80:20 (v/v)) y  
 con agitación durante una hora. A continuación, la tierra extractada se centrifugó y  
 filtró. La concentración de DHFG extractada se determinó por HPLC-Fluorescencia. En  
 la Tabla 11 se expresan las cantidades determinadas de 3,4 DHFG por gramo de tierra  
 20 a tiempo 0, 24 y 48 h tras la aplicación.

**Tabla 11.** Cantidad de DHFG añadida y extractada en las muestras de tierra expuestas a radiación solar o en oscuridad.

[DHFG]	mg DHFG g/m <sup>2</sup> añadidos	mg DHFG g/m <sup>2</sup> tierra 0h	mg DHFG g/m <sup>2</sup> tierra 24h	mg DHFG g/m <sup>2</sup> tierra 48h
100 ppm luz	4,00	0,83	0,78	0,37
100 ppm oscuridad	4,00	0,81	0,73	0,29
500 ppm luz	20,00	7,65	7,65	3,91
500 ppm oscuridad	20,00	6,66	4,04	2,87
1000 ppm luz	40,00	31,20	9,82	1,56
1000 ppm oscuridad	40,00	22,46	8,73	0,87

25



Se observa en la Tabla 11 que al añadir el DHFG a la tierra de cultivo, gran parte del compuesto DHFG no llega a recuperarse en los primeros extractos y que su concentración en la tierra va disminuyendo con el tiempo, reduciéndose drásticamente a las 48h. Hay que destacar que a la más baja concentración no se aprecian diferencias entre el ensayo con y sin luz, sin embargo a las dos concentraciones más altas sí se llegan apreciar diferencias, siendo los valores más altos los encontrados con incidencia solar. Los valores que permanecen más altos son los correspondientes a la concentración de 500 ppm, observándose una mayor bajada de concentración para 1000 ppm. Con este ensayo se verifica que el DHFG puede permanecer estable, con independencia a la luz solar, en tierra durante un periodo de 48 horas sin el uso de adyuvantes.

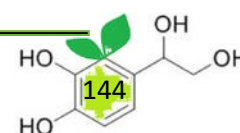
#### **Ejemplo 9. Ensayos de oxidación del compuesto DHFG a pH ácido y pH básico de la muestra.**

Para demostrar que el DHFG no se degrada en disolución acuosa tanto a pH ácido como básico se realizó una prueba de oxidación forzada a dos pHs.

En primer lugar se llevó a cabo una cinética de oxidación del extracto rico en DHFG en condiciones de baja concentración a temperatura ambiente y con un flujo continuo de aire, y al pH original de la muestra, pH ácido (6.3). Brevemente, se partió de un extracto de DHFG cuya concentración es de 0.4 g/L al 96% de pureza (es el mismo extracto que se ha empleado en los ejemplos anteriores para los ensayos antigerminativos) y se tomaron dos tubos de ensayo con 5 mL de dicho extracto en cada tubo. Se hizo pasar una corriente de oxígeno directa a través de sendos tubos midiendo la concentración de DHFG según el perfil cinético mostrado en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Cinética de oxidación del compuesto DHFG a pH ácido 6.3.

Tiempo (h)	[DHFG] g/L	V <sub>final</sub> DHFG (mL)	g totales DHFG
0	0.40	5.00	2.00
0.5 (duplicado 1)	0.40	5.00	2.00
0.5 (duplicado 2)	0.40	5.00	2.00
1 (duplicado 1)	0.46	4.35	2.00
1 (duplicado 2)	0.47	4.25	2.00
2 (duplicado 1)	0.56	3.50	1.96



WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

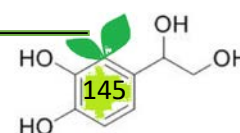
31

Tiempo (h)	[DHFG] g/L	V <sub>final</sub> DHFG (mL)	g totales DHFG
2 (duplicado 2)	0.57	3.50	1.96
3 (duplicado 1)	0.70	2.85	1.99
3 (duplicado 2)	0.60	3.30	1.98
4 (duplicado 1)	0.81	2.35	1.90
4 (duplicado 2)	0.92	2.15	1.98
5 (duplicado 1)	1.15	1.70	1.95
5 (duplicado 2)	1.51	1.30	1.96
8 (duplicado 1)	Sólido	0	2.01
8 (duplicado 2)	Sólido	0	1.98

- Como se puede apreciar la concentración del compuesto DHFG aumenta por el efecto de la evaporación de la muestra, pero la cantidad de DHFG permanece constante en el tiempo, con lo cual se puede concluir que con una corriente de oxígeno y tras cinco
- 5 horas de ensayo, no se aprecia pérdida del componente principal del extracto. Se continuó hasta llevar el extracto a sequedad (8 horas), momento en el que se redisolvió el sólido hasta el volumen inicial y se determinó la concentración observándose que no se había perdido nada del compuesto DHFG inicial.
- 10 Se llevó a cabo el mismo ensayo que se ha descrito anteriormente pero a pH 8. Para ello, se tomaron 20 mL del mismo extracto citado anteriormente y se llevó a pH 8 con una disolución de NaOH al 10%. Se tomó un mL de muestra por duplicado, por la que se le hizo pasar una corriente de oxígeno hasta sequedad (Tabla 13). Seguidamente se redisolvió con 1 mL de agua destilada y se midió su concentración, haciendo todo el
- 15 ensayo por duplicado.

**Tabla 13.** Cinética de oxidación del compuesto DHFG a pH básico 8.

Tiempo (h)	[DHFG] g/L	V <sub>final</sub> DHFG (mL)	g totales DHFG
0	0.40	5.00	2.00
0.5 (duplicado 1)	0.40	5.00	2.00
0.5 (duplicado 2)	0.40	5.00	2.00
1 (duplicado 1)	0.48	4.20	2.00
1 (duplicado 2)	0.46	4.25	1.97





WO 2018/083361

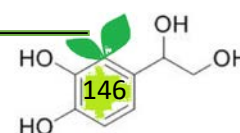
PCT/ES2017/070724

32

Tiempo (h)	[DHFG] g/L	V <sub>final</sub> DHFG (mL)	g totales DHFG
2 (duplicado 1)	0.64	3.05	1.95
2 (duplicado 2)	0.64	3.10	1.98
3 (duplicado 1)	0.74	2.60	1.92
3 (duplicado 2)	0.76	2.45	1.87
4 (duplicado 1)	0.90	2.00	1.80
4 (duplicado 2)	0.86	2.10	1.81
5 (duplicado 1)	2.09	0.85	1.78
5 (duplicado 2)	1.98	0.95	1.88
8 (duplicado 1)	Sólido	0	1.75
8 (duplicado 2)	Sólido	0	1.90

Al igual que se ha indicado anteriormente cuando el pH es ácido, tampoco a pH básico se produce pérdida significativa del compuesto DHFG por oxidación cuando se somete el extracto rico en dicho compuesto a pH básico. Por tanto, se concluye que en las condiciones ensayadas, pH ácido (pH 6.3) y pH básico (pH 8), no se produce oxidación alguna del compuesto DHFG.

Por lo tanto, la presente invención demuestra el carácter fitoregulador del DHFG como compuesto natural, y que el uso de adyuvantes mejora sustancialmente su actividad en campo. El uso de dichos adyuvantes, en combinación con el compuesto DHFG, según se ha demostrado en la presente invención ejerce un efecto diferente al que deberían ejercer y para el que están diseñados, ya que el DHFG penetra en la planta, permanece estable en la semilla y en el suelo independientemente del pH o de la incidencia solar sin la ayuda de dichos adyuvantes.



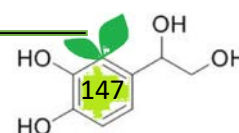
WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

33

**REIVINDICACIONES**

1. Uso del 3,4 dihidroxifenilglicol (DHFG) como fitorregulador.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1 caracterizado por que el DHFG se obtiene a partir de subproductos derivados de la extracción del aceite de oliva y/o de la industria de aderezo de la aceituna, caracterizado por que comprende una concentración de DHFG de entre 1 a 50000 ppm.
- 10 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 donde la actividad fitorreguladora se selecciona entre actividad herbicida frente a malas hierbas o actividad potenciadora del crecimiento de cultivos agrícolas.
4. Uso según la reivindicación 3 donde la actividad herbicida se lleva a cabo cuando se aplica una concentración de entre 100 a 50000 ppm de DHFG.
- 15 5. Uso según la reivindicación 4 donde la actividad herbicida se lleva a cabo cuando se aplica una concentración de entre 500 a 9000 ppm de DHFG.
- 20 6. Uso según la reivindicación 3 donde la actividad potenciadora del crecimiento se lleva a cabo cuando se aplica una concentración de entre 1 a 1500 ppm de DHFG.
7. Uso según la reivindicación 6 donde la actividad potenciadora del crecimiento se lleva a cabo cuando se aplica una concentración de entre 1 a 500 ppm de DHFG.
- 25 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en combinación con al menos un adyuvante.
9. Uso según la reivindicación 8 donde el adyuvante se selecciona de entre cualquiera de la lista que consiste en: adyuvantes a base de aceite y mezclas, adyuvantes a base de organosilicona y mezclas, adyuvantes de base no iónica y mezclas, adyuvantes de base polimérica y mezclas, y adyuvantes a base de ácidos grasos y mezclas, y combinaciones de los mismos.
- 30 10. Uso según la reivindicación 9 donde el adyuvante se selecciona de entre araoil y/o biopower.
- 35



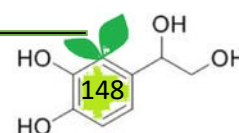
WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

34

11. Extracto obtenido a partir de subproductos derivados de la extracción del aceite de oliva y/o de la industria de aderezo de la aceituna, caracterizado por que comprende una concentración de DHFG de entre 1 a 50000 ppm.
- 5
12. Composición fitorreguladora que comprende DHFG según cualquiera de las reivindicaciones 1a 7 y/o un extracto según la reivindicación 11.
13. Composición según la reivindicación 12 que además comprende al menos un
- 10 adyuvante.
14. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13 caracterizada por que el adyuvante se selecciona de entre cualquiera de la lista que consiste en: adyuvantes a base de aceite y mezclas, adyuvantes a base de organosilicona y
- 15 mezclas, adyuvantes de base no iónica y mezclas, adyuvantes de base polimérica y mezclas, y adyuvantes a base de ácidos grasos y mezclas, y combinaciones de los mismos.
15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14 donde el adyuvante
- 20 se selecciona de entre araoil y/o biopower.
16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15 caracterizada porque la concentración de DHFG es de entre 1 a 50000 ppm.
- 25 17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16 caracterizada porque tiene acción herbicida cuando la concentración de DHFG es de entre 100 a 50000 ppm y actividad potenciadora del crecimiento cuando la concentración de DHFG es de 1 a 1500 ppm.
- 30 18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17 caracterizada porque tiene acción herbicida cuando la concentración de DHFG es de entre 500 a 9000 ppm y actividad potenciadora del crecimiento cuando la concentración de DHFG es de 1 a 500 ppm.

35



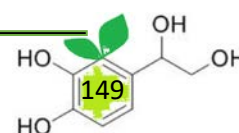
WO 2018/083361

PCT/ES2017/070724

35

19. Método para el control de las malas hierbas que comprende administrar a un cultivo una dosis efectiva de DHFG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, del extracto según la reivindicación 11, o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18.
- 5
20. Método según la reivindicación 19 caracterizado por que la dosis efectiva se administra en el rango de entre 100 a 50000 ppm.
21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20 caracterizado por que la
- 10 dosis efectiva se administra en el rango de entre 500 a 9000 ppm.
22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21 dónde las malas hierbas son preferentemente monocotiledóneas y/o dicotiledóneas.
- 15
23. Método según la reivindicación 22 donde las plantas monocotiledóneas se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes especies: *Lolium rigidum*; *Lolium multiflorum*, y las dicotiledóneas se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes especies: *Sinapis arvensis*, *Chenopodium álbum* y *Stellaria media*.
- 20
24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23 caracterizado por que la dosis efectiva de DHFG, del extracto o de la composición, se administran vía aspersión, atomización, dispersión, recubrimiento, o vertido.
- 25
25. Método para inducir el crecimiento de cultivos que comprende administrar a un cultivo una dosis efectiva de DHFG según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, de extracto según la reivindicación 11, o de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 18.
26. Método según la reivindicación 25 caracterizado por que la dosis efectiva se
- 30 administra en el rango de entre 1 a 1500 ppm.
27. Método según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 26 caracterizado por que la dosis efectiva se administra en el rango de entre 1 a 500 ppm.

35



WO 2018/083361

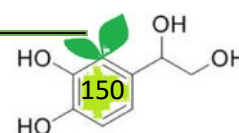
PCT/ES2017/070724

36

28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27 dónde los cultivos son preferentemente cultivos de monocotiledóneas y/o dicotiledóneas.

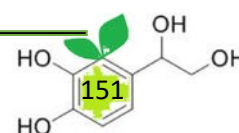
29. Método según la reivindicación 28 donde los cultivos de monocotiledóneas se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes especies: *Triticum aestivum*  
5 *Allium cepa*, y los cultivos de dicotiledóneas se seleccionan de entre cualquiera de las siguientes especies: *Lepidium sativum* L., *Lactuca sativa* L., *Lycopersicum esculentum* L., *Solanum tuberosum* L., *Solanum melongena* L., *Capsicum* L.;  
10 *Cucumis sativus* L., *Cucurbita pepo* L., *Citrullus lanatus* L., *Asparagus officinalis* L.

30. Método según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29 caracterizado por que la dosis efectiva de DHFG, del extracto o de la composición, se administran vía aspersión, atomización, dispersión, recubrimiento, o vertido.



# Capítulo V

Procedimiento de obtención de  
3,4-dihidroxifenilglicol.



## Resumen Capítulo V

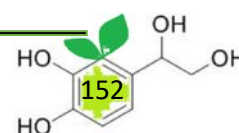
Se procedió a la cuantificación de todas las posibles fuentes de DHFG con el objetivo de buscar un sistema sencillo y muy económico que permitiera su purificación de forma que la concentración de HT estuviera por debajo del 10% respecto a la del DHFG para evitar efectos antagónicos en su uso agrícola, como se demostró en la anterior patente de uso como fitorregulador.

Posteriormente se diseñó un nuevo sistema a partir de las distintas fuentes que dio lugar a un novedoso sistema que permite la obtención de un extracto rico en DHFG con baja concentración de HT. Este extracto se obtiene solo por procedimientos físicos y económicos y permite la extracción del DHFG con un porcentaje de HT inferior al 10%, lo cual posibilita su uso agrícola.

La presente invención se refiere a un procedimiento de extracción del fenol DHFG a partir de cualquier parte de la planta, productos o subproductos derivados del olivo o cualquier otro producto vegetal de la familia *Oleaceae*, *Orobanchaceae*, *Plantaginaceae*, *Compositae*, *Lamiaceae*, *Acanthaceae* y/o *Scrophulariaceae*, particularmente en la hoja de olivo, y en el aceite de oliva (OA) con una baja liberación del fenol HT.

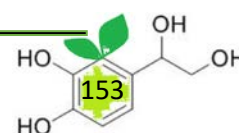
El fenol DHFG está presente junto con el HT en el aceite de oliva y las aceitunas de mesas, encontrándose el HT presente en mayor cantidad que el DHFG, normalmente aparecen en la naturaleza en relación 10:1. La dificultad de separar ambos fenoles radica en su similitud estructural y como consecuencia de ello, los sistemas para su purificación se encarecen, no permitiendo su desarrollo a nivel agronómico y dificultando su desarrollo a otros niveles como la alimentación o la cosmética, entre otros.

Con anterioridad a este trabajo, nuestro grupo de investigación describió un procedimiento de purificación de DHFG a través de su retención y desorción en resinas





iónicas (ver ES2341526B1). En dicho proceso se utilizan combinaciones de resinas de intercambio iónico para poder separar el DHFG del HT, y en todos los casos se absorbe y se eluye el DHFG para su purificación. Al absorberse completamente el DHFG dificulta su separación del HT, ya que al ser químicamente muy parecidos se eluyen prácticamente al mismo tiempo. Esto supone, por un lado, el empleo de más de un tipo de resina y columna y por otro una gran pérdida de DHFG y una alta degradación. Todo ello se traduce en elevados costes para la purificación del DHFG y la obtención de extractos en donde el HT está también presente en altas concentraciones. Por tanto, se buscó un procedimiento que permitiese extraer DHFG libre de HT y de oleuropeína y que, en consecuencia, fuera más económico que los descritos hasta la fecha y permitiera que el DHFG de alta pureza así obtenido se pueda utilizar en el campo de la agronomía. Para ello, se puso a punto un procedimiento en el que haciendo un tratamiento térmico a la fuente de DHFG y controlando temperatura y tiempo se puede obtener un extracto rico en DHFG y con una muy baja concentración de HT libre. De esta forma el DHFG es más fácil de separar del HT conjugado a través de su elución por una resina de intercambio iónico cuya finalidad es la de conseguir una separación completa del fenol buscado y del resto de los presentes en el extracto original. Como principales productos la presente invención permite la obtención de un extracto rico en DHFG y de otro rico en oleuropeína y sus derivados.





**TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES  
NOTIFICACIÓN DE LA RECEPCIÓN DE LOS DOCUMENTOS QUE  
CONSTITUYEN SUPUESTAMENTE UNA SOLICITUD INTERNACIONAL  
PRESENTADA DE FORMA ELECTRÓNICA.**

**(Instrucciones Administrativas del PCT, Parte Séptima)**

- 1.-Se notifica al solicitante que la Oficina Receptora ha recibido en la fecha de recepción indicada más abajo, los documentos que supuestamente constituyen una solicitud internacional.
- 2.-Se llama la atención del solicitante sobre el hecho de que la Oficina Receptora no ha comprobado aún si estos documentos satisfacen las condiciones del art. 11.1, es decir, si cumple los requisitos para que le sea atribuida una fecha de presentación internacional. En cuanto la Oficina Receptora haya comprobado los documentos, avisará al solicitante.
- 3.-El número de la supuesta solicitud internacional indicado más abajo ha sido otorgado automáticamente a estos documentos. Se invita al solicitante a mencionar este número en toda la correspondencia con la Oficina Receptora.

Número de presentación	300411140	
Solicitud Número PCT	PCT/ES2021/070384	
Fecha de recepción	28 mayo 2021	
Oficina Receptora	Oficina Española de Patentes y Marcas, Madrid	
Referencia del expediente del solicitante o mandatario	PCT1641.1532	
Solicitante	CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)	
Número de solicitantes	2	
País	ES	
Título de la invención	Procedimiento de obtención de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG)	
Documentos presentados	eolf-pkda.xml eolf-appb.xml eolf-vlog.xml eolf-appb-P000002.pdf (3 p.) eolf-appb-P000004.pdf (1 p.)	eolf-requ.xml eolf-fees.xml eolf-appb-P000001.pdf (9 p.) eolf-appb-P000003.pdf (1 p.) eolf-othd-000001.zip

	eolf-othd-000002.pdf (1 p.)	
Presentado por	C=ES,O=PONS PATENTES Y MARCAS INTERNACIONAL SL,2.5.4.97=#0C0F56415445532D423834393231373039,CN=50534279J ANGEL PONS (R: B84921709),SN=PONS ARIÑO,givenName=ANGEL,serialNumber=IDCES-50534279J,description= Reg:28065 /Hoja:M-421468 /Tomo:23494 /Folio:199 /Fecha:22/02/2012 / Inscripción:9	
Método de Transmisión	Online	
Fecha y hora de expedición del recibo	28 mayo 2021, 11:22 (CEST)	
Información oficial condensada de la presentación	04:18:40:38:F4:E0:0A:41:CF:37:5D:5A:03:CF:8E:5C:56:2F:05:1E	

/Madrid, Oficina Receptora/

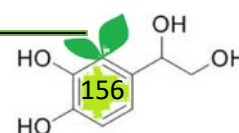
## DESCRIPCIÓN

### Procedimiento de obtención de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG)

La presente invención se refiere a un procedimiento de extracción del fenol 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) a partir de cualquier parte de la planta, productos o subproductos derivados del olivo o cualquier otro producto vegetal de la familia Oleaceae, Orobanchaceae, Plantaginaceae, Compositae, Lamiaceae, Acanthaceae y/o Scrophulariaceae, particularmente en la hoja de olivo, y en el aceite de oliva (OA) con una baja liberación del fenol hidroxitirosol (HT).

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Uno de los fenoles más estudiados es el hidroxitirosol (HT), que es un fenol simple cuya propiedad más destacada y estudiada es la de su carácter antioxidante en distintos tipos de matrices (Rodríguez., G., Rodríguez., R., Fernández-Bolaños., J., Guillén., R., Jiménez, A. (2007). Antioxidant activity of effluents during the purification of hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenyl glycol from olive oil waste. European Food Research and Technology.V 224, Issue 6, pp 733-741; Bermudez-Oria, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Rubio-Senet, F., Fernández-Prior, A., Fernández-Bolaños, J, (2018). Effect of edible pectin-fish gelatin films containing the olive antioxidants hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol on beef meat during refrigerated storage. Meat Science. V 148, pp 213-218; y Bermúdez-Oria, A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Fernández-Prior, M.A., Vioque, B., Fernández-Bolaños, J. (2019). Strawberry dietary fibre functionalized with phenolic antioxidants from olives. Interactions between polysaccharides and phenolic compounds. Food Chemistry), sin embargo, hay que resaltar muchas otras como potente

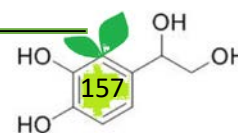


antimicrobiano de amplio espectro en distintos tipos de cepas bacterianas (Natasa Zoric, Igor Horvat, Nevenka Kopjar, Ante Vucemilovic, Dario Kremer, Sinisa Tomic, Ivan Kosalec., (2013). Hydroxytyrosol Expresses Antifungal Activity in vitro. Current Drug Targets.V 14, Issue 9; y Eilami O., Manuela Oliverio., Saeid Hosseinian., Amin Hossaini Motlagh., Mohsen Naghmachi., (2017). Antimicrobial Effects of Hydroxytyrosol Extracted From Olive Leaves, on Propionibacterium Acnes. Middle East Journal of family Medicine. V 15, Issue 10), antiapoptótico contra células cancerígenas (Burattini, S., Baldassarri, S., Accorsi, A., Piatti, E., Madrona, A., Espartero, J.L., Candiracci, M., Zappia, C., Falciera, E, (2013). Anti-apoptotic activity of hydroxytyrosol and hydroxytyrosyl laurate. Food and Chemical Toxicology.V 55, pp 248-256), presenta alta toxicidad frente al virus VIH (Bedoya et al, 2016) además de poseer efecto antiinflamatorio (Zhang, X., Cao, J., Zhong, L, (2009). Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, iNOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. V379. Issue 6, pp 581-586).

El fenol 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) está presente junto con el fenol hidroxitirosol (HT) en el aceite de oliva y las aceitunas de mesas, además, el HT está presente en mayor cantidad que el DHFG.

El DHFG se ha descrito como fitorregulador natural (ver Denfeld, Quin E., Habecker, Beth A., Woodward, William R, (2019). Measurement of plasma norepinephrine and 3,4-dihydroxyphenylglycol: Method development for a translational research study. BMC Research Notes), pero este uso lo presenta cuando la cantidad de HT que le acompaña es muy baja o nula.

La dificultad de separar ambos fenoles conlleva a sistemas que encarecen su purificación, no permitiendo su desarrollo a nivel agronómico y dificultando su desarrollo a otros niveles como la alimentación o la cosmética, entre otros.



En el estado de la técnica se ha descrito un procedimiento de purificación de DHFG a través de su retención y desorción en resinas iónicas (ver ES2341526B1). En dicho proceso se utilizan combinaciones de resinas de intercambio iónico para poder separar el DHFG del HT, y en todos los casos se absorbe y se eluye el DHFG para su purificación. Al absorberse completamente el DHFG dificulta su separación del HT, ya que al ser químicamente muy parecidos se eluyen prácticamente al mismo tiempo. Por lo tanto, supone por un lado el empleo de más de un tipo de resina y columna y por otro una gran pérdida de DHFG y una alta degradación. Todo ello se traduce en elevados costes para la purificación del DHFG y la obtención de extractos en donde el HT está también presente en altas concentraciones.

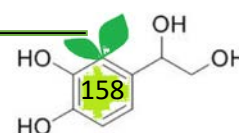
Así pues, los procedimientos de extracción de DHFG descritos en el estado de la técnica tienen la desventaja de que la concentración de HT presente en el extracto es muy alta o el DHFG se degrada en cierta proporción.

Por tanto, sería deseable disponer de un procedimiento que permitiese extraer DHFG libre de HT y que, en consecuencia, sea más económico que los descritos hasta la fecha y permita que el DHFG de alta pureza así obtenido se pueda utilizar en el campo de la agronomía.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) que comprende las etapas de:

i) tratamiento térmico (T1) a una temperatura de entre 25 °C y 140 °C de la fuente de DHFG (F0) disuelta en agua o en una disolución de etanol en agua con una concentración de etanol en agua de entre 10% y 50% (v/v) , durante un tiempo de entre 20 minutos y 5



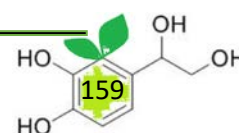
h, con una rampa de temperatura inferior a 10 minutos para liberar una fracción líquida (A1) que contiene: entre 0,01 g/L y 2,5 g/L de DHFG (DHFG-E), entre 0,001 g/L y 0,25 g/L de HT, y entre 0,03 y 15 g/L de formas conjugadas de HT, usando relaciones de la fuente de DHFG (F0) y el agua o en una disolución de etanol en agua de entre 5:1 (kg:L) y 1:20 (kg:L); y ii) cromatografía de la fracción líquida (A1) obtenida tras el tratamiento térmico de la etapa (i) utilizando una resina aniónica (C1) a un pH de entre 5 y 8 para retener las formas conjugadas de HT y más del 70% del HT libre y para obtener una fracción líquida no retenida en la columna cromatográfica de DHFG (DHFG-E) con una concentración de entre 0,005 g/L y 2,5 g/L de DHFG de concentración usando relaciones de la fuente de DHFG (F0) y el agua o en una disolución de etanol en agua de entre 5:1 (kg:L) y 1:20 (kg:L)..

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde el tratamiento térmico (T1) de la etapa (i) se lleva a cabo entre 90 °C y 140 °C, preferiblemente entre 90 °C y 130 °C, y más preferiblemente a 120 °C.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde el tratamiento térmico (T1) de la etapa (i) se lleva a cabo a una temperatura de entre 90 °C y 140 °C, preferiblemente entre 90 °C y 130 °C, y más preferiblemente a 120 °C, durante un tiempo de entre 10 minutos y 1,5 h con una rampa de temperatura inferior a 5 minutos.

Es importante que la fuente de DHFG (F0) sea rica en este compuesto y, también, que tenga una concentración de HT libre por debajo del 10% de la concentración de DHFG. Así, una de las fuentes preferidas de la invención es la hoja de olivo.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde la fuente de DHFG (F0) es cualquier parte de la planta, productos o subproductos





derivados del olivo o cualquier otro producto vegetal de la familia Oleaceae, Orobanchaceae, Plantaginaceae, Compositae, Lamiaceae, Acanthaceae y/o Scrophulariaceae, preferiblemente cualquier planta, productos o subproductos derivados del olivo, y más preferiblemente la hoja de olivo.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde las formas conjugadas de HT son oleuropeína, glucósido del HT y sus derivados secoiridoides, y preferiblemente las formas conjugadas de HT son oleuropeína.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde la fracción líquida A1 obtenida en la etapa (i) se somete a una etapa de centrifugación, filtración y/o sedimentación antes de la etapa (ii).

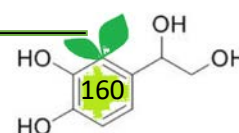
En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde la fuente de DHFG (F0) está disuelta en agua.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde la fuente de DHFG (F0) es hoja de olivo y está disuelta en agua.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde la resina aniónica (C1) de la etapa (ii) es una resina aniónica débil.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento descrito anteriormente, donde la etapa (ii) se lleva a cabo a un pH de 6,5.

Así pues, el procedimiento de obtención de DHFG sin hidroxitirosol (HT) de la presente invención se basa en obtener una fuente sin o con muy baja concentración de HT libre. Es por ello por lo que los ensayos se han realizado con hoja de olivo en donde hay una importante concentración de DHFG y el HT está conjugado formando la oleuropeína.



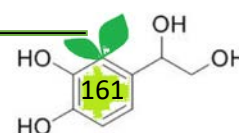
En la primera etapa del procedimiento (etapa (i)) se aplica un tratamiento que solubilice el DHFG de la fuente, particularmente de la hoja de olivo, sin que el HT se llegue a liberar, permaneciendo en forma conjugada.

Tratamientos térmicos por encima de 140 °C para todos los tiempos ensayados producen una liberación y cierta degradación del DHFG seguida de una importante hidrólisis de las formas conjugadas de HT, y en particular de la oleuropeína. Tratamientos en donde la muestra haya sufrido una rampa de calentamiento superior a 10 minutos han supuesto una importante hidrólisis de las formas conjugadas de HT, en particular de la oleuropeína, a pesar de una buena solubilización del DHFG, por lo que se ha generado mucho HT libre, lo cual es no deseable en este proceso.

La primera etapa de tratamiento térmico del procedimiento de extracción de DHFG permite obtener una fuente líquida rica en DHFG que, a continuación, habrá que se separar de las formas conjugadas de HT, fundamentalmente la oleuropeína, el glucósido del HT y sus derivados secoiridoides.

La segunda etapa del procedimiento es la aplicación de un sistema cromatográfico a la fuente líquida rica en DHFG obtenida en la etapa anterior de tratamiento, en donde no se retiene el DHFG y sí se retienen las formas conjugadas de HT tales como la oleuropeína y los demás precursores del HT. Dicha cromatografía se lleva a cabo con resinas de tipo iónico.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente, que además comprende una etapa (iii) de purificación (T2) de la fracción DHFG-E obtenida en la etapa (ii) para obtener DHFG con un grado de pureza mayor (DHFG-P) tras su retención en la columna (C1).



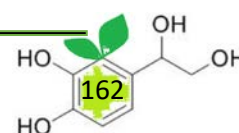
En otra realización, la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente donde la purificación (T2) de la etapa (iii) se lleva a cabo por cromatografía con resinas catiónicas, resinas aniónicas o mezclas de las mismas para obtener DHFG-P con un grado de pureza de hasta al menos un 80% en peso seco del DHFG-E obtenido en la cromatografía de la etapa (ii) reteniéndolo en la columna.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente donde la purificación (T2) de la etapa (iii) se lleva a cabo por cromatografía con resinas de adsorción y elución con agua y/o etanol para obtener DHFG-P con un grado de pureza de hasta un 99,6% en peso seco del DHFG-E obtenido en la cromatografía de la etapa (ii) reteniéndolo en la columna.

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente donde la purificación (T2) de la etapa (iii) se lleva a cabo por filtración con membranas de filtración, nanofiltración o de ultrafiltración para aumentar el grado de pureza de entre un 20% y un 60% en peso seco del DHFG obtenido en la cromatografía de la etapa (ii).

En otra realización, la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente donde la purificación (T2) de la etapa (iii) se lleva a cabo por ósmosis inversa para eliminar parte del contenido en agua sin variar el grado de pureza de DHFG-P.

En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente, que además comprende una etapa (iv) de elución con agua, etanol o sus mezclas de los conjugados de HT retenidos en la columna C1 de la etapa (ii), preferiblemente de oleuropeína, para obtener un extracto rico en oleuropeína (Oleuro-E), las moléculas que componen el Oleuro-E y/o otros derivados secoiridoides, preferiblemente para obtener un extracto rico en oleuropeína (Oleuro-E), hidroxitirosol (HT-E), ácido elenólico y/o sus derivados, más preferiblemente para obtener un extracto rico en oleuropeína (Oleuro-E),



hidroxitirosol (HT-E) y/o ácido elenólico, y aún más preferiblemente para obtener un extracto rico en oleuropeína (Oleuro-E).

En otra realización la invención se refiere al procedimiento definido anteriormente que además comprende una etapa (v) de hidrólisis química o enzimática (T3) del extracto de Oleuro-E obtenido en la etapa (iv) o para obtener un extracto rico en HT (HT-E).

Así pues, la presente invención permite disponer de un tratamiento efectivo de extracción de DHFG en el que no se libere el HT y en el que no se degrade el DGFH.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1**

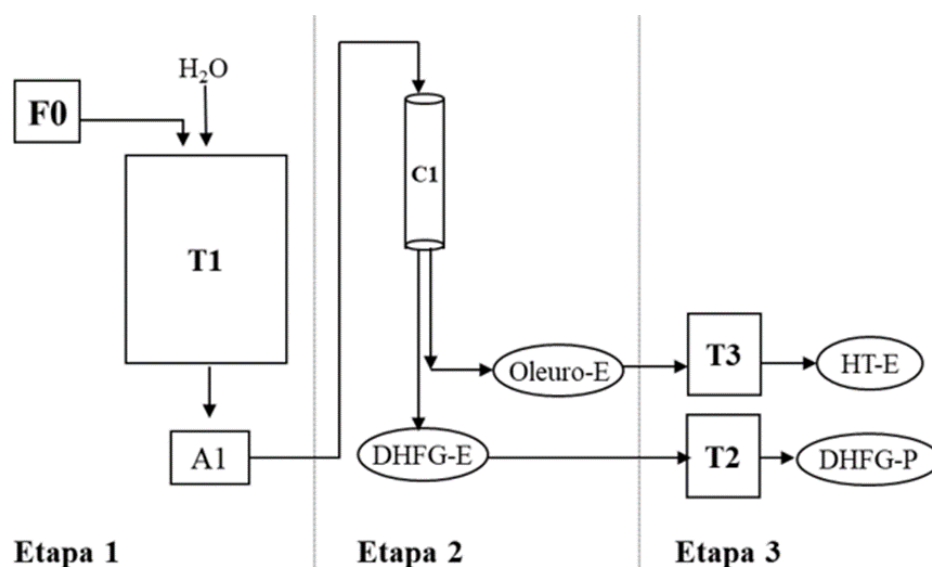
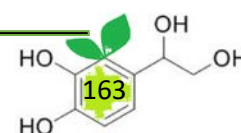


Fig. 1

muestra el esquema básico del procedimiento: F0 es la fuente de DHFG, T1 es el



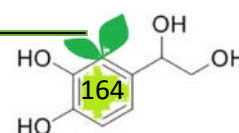
tratamiento térmico, A1 es la fracción líquida, C1 es la columna de intercambio iónico, T2 resina iónica o mezcla, resina de absorción o filtración por membrana y T3 es una hidrólisis ácida o enzimática.

## EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que pone de manifiesto la efectividad del procedimiento de la invención.

En la figura 1 se muestra el esquema básico del procedimiento:

- Etapa 1: Corresponde a la etapa (i) de procedimiento de la invención. En esta etapa la fuente de DHFG (F0), caracterizada por que posee poca concentración de HT libre, se somete a un tratamiento térmico (T1) en el que logre solubilizar al DHFG evitando la hidrólisis de los precursores de HT, y con ello evitando la formación de HT libre. En el caso de tratarse de una fuente sólida o semisólida será necesaria la adición de agua (o una disolución de etanol en agua) dependiendo del grado de humedad de dicha fuente. Finalmente, el líquido (A1) se obtiene por centrifugación, filtración y/o sedimentación.
- Etapa 2: Corresponde a la etapa (ii) del procedimiento de la invención, donde la fracción líquida A1 se hace pasar a través de una columna de intercambio iónico (C1) que no retenga la mayor parte del DHFG, de forma que la propia fracción A1 forme el primer producto final, el extracto de DHFG libre o con bajo contenido en HT (DHFG-E). Para ello se puede utilizar una resina de tipo aniónica débil activada parcialmente con una disolución ácida a pH entre 5 y 8. Opcionalmente, posteriores eluciones con agua o con disolventes orgánicos como el etanol permiten la obtención de un segundo extracto rico en oleuropeína (Oleuro-E) (etapa (iv) opcional del procedimiento de la invención).



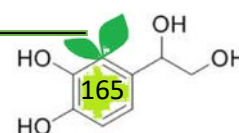
- Etapa 3: Corresponde a la etapa (iii) opcional de la invención, donde la fracción DHFG-E puede ser sometida a filtración por membranas de nano y/o ultrafiltración y/o a un paso cromatográfico con resina de intercambio iónico (T2) o de adsorción para obtener finalmente un producto con un mayor grado de pureza de DHFG-P. Por otra parte, a partir del extracto Oleuro-E obtenido en la etapa (iv) opcional, se puede obtener un extracto rico en HT (HT-E) (T3) mediante la etapa (v) opcional de hidrólisis química o enzimática.

#### Ejemplo 1: Experimento de laboratorio:

El ejemplo consiste en el tratamiento térmico a 120 °C en un sistema de autoclave de la hoja de olivo en agua durante 30 minutos usando 200 g de la hoja parcialmente molida (F0) para aumentar la superficie de extracción. Se obtiene un litro de un líquido (A1) tras filtrar con una tela filtrante con una concentración de 0,25 g/L de DHFG, 0,02 g/ de HT y de 0,7 g/L de oleuropeína entre otros fenoles.

El líquido se hace pasar por una columna de resina iónica tipo aniónica débil (C1), obteniéndose una fracción no retenida (1L) con una concentración de 0,21 g/L de DHFG (con una pureza de entre el 5-20 % referido a peso seco), trazas de HT (< 0,01 g/L) y trazas de sus precursores (< 0,05 g/L). Esta fracción puede ser ya usada como fracción rica de DHFG (DHFG-E) evitando el efecto antagónico del HT, y por tanto posibilitando su uso agronómico entre otros.

Por otro lado, al continuar la elución de la columna con agua se obtiene un licor de 3 L con una concentración de oleuropeína de 0,15 g/L y una pureza en peso seco de entre 10-60% (Oleuro-E).



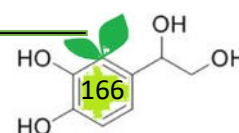
## Ejemplo 2: Experimento en planta piloto.

Se trataron 10 kg de hoja de olivo parcialmente trituradas (F0) en un reactor con calentamiento directo e indirecto con vapor de agua a 130 °C durante 30 minutos, evitando rampas de temperatura. Se obtuvieron 10 L de líquido (A1) una vez separados en una centrífuga de maya, con una concentración de 0,30 g/L de DHFG, 0,07 g/L de HT y 0,5 g/L de oleuropeína. Los 10 L se pasaron a través de una columna con 30 L de resina aniónica débil (C1), obteniendo los 10 L pasados con una concentración de 0,25 g/L de DHFG y por debajo de los 0,001 g/L de HT y trazas de oleuropeína (DHFG-E).

A continuación, la columna C1 se eluyó con agua hasta obtener 50 L con una concentración de oleuropeína de 0,08 g/L y una pureza en peso de 10-30 %.

Partiendo del extracto DHFG-E se usaron 20 L de una resina mixta catiónica fuerte con aniónica (T2) en donde se retuvo el 95 % del DHFG, que fue finalmente eluida con agua obteniendo un producto final con una pureza por encima del 85 % de DHFG (DHFG-P).

Partiendo del extracto de Oleuro-E se realizó una hidrólisis ácida con ácido clorhídrico 3N a 100 °C durante 15 minutos, resultado la hidrólisis total de la oleuropeína alcanzando los 30 mg/L de HT (HT-E).





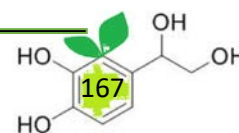
## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) que comprende las etapas de:

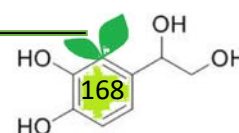
i) tratamiento térmico (T1) a una temperatura de entre 90 °C y 140 °C de la fuente de DHFG (F0) disuelta en agua o en una disolución de etanol en agua con una concentración de etanol en agua de entre 10% y 50% (v/v), durante un tiempo de entre 10 minutos y 1,5 h con una rampa de temperatura inferior a 5 minutos para liberar una fracción líquida (A1) que contiene: entre 0,01 g/L y 2,5 g/L de DHFG (DHFG-E), entre 0,001 g/L y 0,25 g/L de HT, y entre 0,03 y 15 g/L de formas conjugadas de HT, usando relaciones de la fuente de DHFG (F0) y el agua o en una disolución de etanol en agua de entre 5:1 (kg:L) y 1:20 (kg:L); y ii) cromatografía de la fracción líquida (A1) obtenida tras el tratamiento térmico de la etapa (i) utilizando una resina aniónica (C1) a un pH de entre 5 y 8 para retener las formas conjugadas de HT y más del 70% del HT libre y para obtener una fracción líquida no retenida en la columna cromatográfica de DHFG (DHFG-E) con una concentración de entre 0,005 g/L y 2,5 g/L de DHFG de concentración usando relaciones de la fuente de DHFG (F0) y el agua o en una disolución de etanol en agua de entre 5:1 (kg:L) y 1:20 (kg:L).

2. El procedimiento según la reivindicación 1, donde el tratamiento térmico (T1) de la etapa (i) se lleva a cabo entre 90 °C y 130 °C.

3. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la fuente de DHFG (F0) es cualquier parte de la planta, productos o subproductos derivados del olivo o cualquier otro producto vegetal de la familia Oleaceae, Orobanchaceae, Plantaginaceae, Compositae, Lamiaceae, Acanthaceae y/o Scrophulariaceae.



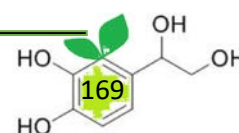
4. El procedimiento según la reivindicación 3, donde la fuente de DHFG (F0) es cualquier planta, productos o subproductos derivados del olivo.
5. El procedimiento según la reivindicación 4, donde la fuente de DHFG (F0) es la hoja de olivo.
6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde las formas conjugadas de HT son oleuropeína, glucósido del HT y sus derivados secoiridoides.
7. El procedimiento según la reivindicación 6, donde las formas conjugadas de HT son oleuropeína.
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la fracción líquida A1 obtenida en la etapa (i) se somete a una etapa de centrifugación, filtración y/o sedimentación antes de la etapa (ii).
9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la fuente de DHFG (F0) está disuelta en agua.
10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la resina aniónica (C1) de la etapa (ii) es una resina aniónica débil.
11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la etapa (ii) se lleva a cabo a un pH de 6,5.
12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que además comprende una etapa (iii) de purificación (T2) de la fracción DHFG-E obtenida en la etapa (ii) para obtener DHFG con un grado de pureza mayor (DHFG-P) tras su retención en la columna (C1).
13. El procedimiento según la reivindicación 12, donde la purificación (T2) de la etapa (iii) se lleva a cabo por cromatografía con resinas catiónicas, resinas aniónicas o



mezclas de las mismas, por cromatografía con resinas de adsorción y elución con agua y/o etanol, cabo por filtración con membranas de filtración, nanofiltración o de ultrafiltración o por ósmosis inversa para eliminar parte del contenido en agua.

14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que además comprende una etapa (iv) de elución con agua, etanol o sus mezclas de los conjugados de HT retenidos en la columna C1 de la etapa (ii), preferiblemente de oleuropeína, para obtener un extracto rico en oleuropeína (Oleuro-E), hidroxitirosol (HT-E), ácido elenólico y/o sus derivados.

15. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que además comprende una etapa (v) de hidrólisis química o enzimática (T3) del extracto de Oleuro-E obtenido en la etapa (iv) o para obtener un extracto rico en HT (HT-E).



# Discusión general

## Discusión general

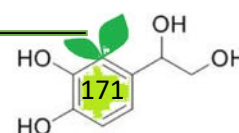
La búsqueda de fuentes del 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) se ha focalizado por los resultados obtenidos en las aguas de alperujo y alperujo tratado térmicamente con los disolventes eutécticos, en el caso de las almazaras, de las aguas de almacenamiento de las aceitunas verdes no tratadas con sosa en el caso de las entamadoras, y de las hojas en ambos casos. Todas ellas suponen fuentes importantes para la extracción y purificación del DHFG, además del resto de los fenoles como es el caso del hidroxitirosol (HT). A partir de estas fuentes se ha llegado a obtener varios extractos y productos puros tanto de DHFG como de HT para realizar estudios de actividad antioxidante, antiinflamatoria y fitorreguladora. A continuación, se exponen los resultados tanto de las nuevas fuentes estudiadas como de las actividades biológicas determinadas.

### 1. Búsqueda de nuevas fuentes de DHFG.

#### 1.1. Búsqueda de fuentes en la industria del aceite de oliva.

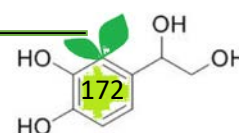
##### 1.1.2. Agua de alperujo

Ha aparecido recientemente una fase líquida procedente del agua contenida en el alperujo almacenado. Esta fase se forma en las balsas y hasta hace poco tiempo se homogeneizaba con el alperujo para su tratamiento. Ahora se extrae de las balsas de alperujo y se almacena en otras balsas para su evaporación y depuración. Los resultados obtenidos muestran que esta fase líquida contiene una cantidad importante de componentes bioactivos como los fenoles, entre los que destacan por su importancia biológica y concentración el HT y el DHPG. El periodo de almacenamiento puede hacer variar la concentración de estos fenoles y de los sólidos en suspensión en función de la profundidad



de la balsa. Para su aprovechamiento sería necesario la separación de fases, de forma que el sólido se devolviera al alperujo para la extracción de la grasa, ya que posee una concentración media de grasa del 8.53% referido a materia seca. El líquido resultando tendría una concentración media cercana a los 4 g/L, siendo los principales fenoles el DHFG, el HT y el TY. Por ello presenta una concentración cuatro veces superior a un alpechín de tres fases de alto contenido fenólico, sin el problema de degradación fenólica que ocurre en las balsas de alpechín, y una concentración similar a la que obtendría tras la aplicación de un tratamiento térmico sobre el alperujo, sin el problema de la degradación térmica del DHFG. Por tanto, el agua de alperujo supondría una interesante fuente para la extracción del DHFG y del HT obteniendo extractos con alta actividad antioxidante, alto poder reductor y presentando una elevada protección a la oxidación lipídica. A partir de una tonelada de agua de alperujo es posible obtener 12,7 y 3,7 kg de extracto seco con un 5,12 y 7,84% de HT y un 0,2 y 0,08% de DHFG para los sistemas de extracción con disolventes y resinas, respectivamente. En ambos casos, esto significa 5,4 kg de sólidos que contienen 1,1 kg de aceite y 4,3 kg de sólidos. La extracción con resina fue más selectiva, aunque para mejorar este sistema sería necesario reutilizar esta fuente varias veces para extraer más fenoles. La reutilización, junto con las ventajas medio ambientales del uso de resinas, hace que este sistema sea actualmente el más utilizado en la industria.

La obtención de DHFG y de HT ayudaría no sólo a revalorizar este efluente sino también a mejorar la formulación de nuevos alimentos a base de antioxidantes naturales, o con fines nutraceuticos o farmacéuticos. También es importante destacar que la eliminación de los fenoles del agua de alperujo mejoraría la depuración de este efluente promoviendo el uso de este sistema como biorrefinería, lo que minimiza el daño ambiental.



### 1.1.3. Alperujo

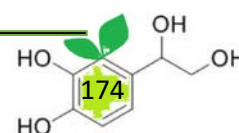
Actualmente se están llevando a nivel industrial tratamientos térmicos que faciliten y mejoren la gestión y aprovechamiento del alperujo. Concretamente se aplica un tratamiento al vapor entre 160 °C y 180 °C y por otra parte un termobatido entre 45 °C y 65 °C. Las ventajas del tratamiento al vapor superan al termobatido, pero por ahora supone mayores costos de operación. A pesar de que el termobatido se está extendiendo más y de que permite una separación de sus fases, la fracción líquida obtenida presenta muchos inconvenientes. Por un lado, su contenido en fenoles simples es bajo y hay que esperar a que se produzca una hidrólisis de los más complejos entre tres y cuatro meses, y por otro presenta muchos sólidos en suspensión que hay que decantar. Sin embargo, estos problemas no aparecen en la aplicación de un sistema de tratamiento al vapor, aunque se produce una degradación térmica del DHFG como principal inconveniente, a parte de los costos. Es por ello, por lo que en el presente trabajo se combinó el uso de los nuevos “disolventes verdes” o disolventes eutécticos profundos (DES) con el tratamiento a 180 °C, con la idea de posibilitar la extracción del DHFG evitando su degradación térmica. Los resultados del trabajo mostraron que el uso de estos disolventes puede reducir la temperatura de tratamiento desde 180 °C hasta 120 °C para obtener los mismos resultados relativos a la concentración de fenoles, azúcares, azúcares ácidos y sólidos en suspensión en la fase líquida, evitando la degradación del DHFG, y por tanto posibilitando su recuperación. La mezcla DES que mejor funcionó estaba formada por cloruro de colina, ácido glicólico y oxálico, y se comprobó que la efectividad era debida a la mezcla eutéctica y no a la acción individual de cada uno de los componentes. Con este trabajo se abre la puerta para poder realizar un tratamiento térmico a menor temperatura que permitiría una mejora considerable respecto a la aplicación del termobatido actual. Sin duda, queda demostrada la viabilidad técnica, pero no la económica, que pasaría por la



formulación de disolventes NADES formulados únicamente con productos obtenidos de forma económica a partir de otros subproductos, como es el caso del cloruro de colina, disminuyendo sustancialmente la relación usada DES:alperujo (1:1), y estudiando la reutilización de dichos disolventes. Por otra parte, también hay que estudiar el uso de estos DES como agentes extractantes y como vehiculizantes al mismo tiempo, es decir que permitan una extracción de los componentes de interés al mismo tiempo que al estar diseñados con componentes no tóxicos y de grado alimenticio, puedan ser usado directamente en la formulación de alimentos funcionales, mejorando la biodisponibilidad de los fenoles que porta. En este sentido el producto final sería de mayor valor y podría justificar el uso de los DES. Son muchas las posibilidades las que ofrece el uso de estos nuevos disolventes, por lo que este tipo de trabajos abre un campo interesante de estudio y de aplicación tanto para la mejora en la gestión del alperujo, como en la mejora de alimentos con propiedades funcionales más activos.

## 1.2. Búsqueda en la industria de la aceituna de mesa.

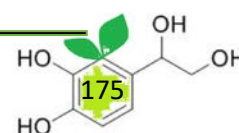
A pesar de que la mayoría de las aceitunas de mesa siguen un procesado a través del uso del NaOH, queda un sector importante en el que se procesan de forma natural a través de la inmersión en salmueras, salmueras acidificadas o aguas acidificadas, como son por ejemplo las aceitunas verdes para su posterior oxidación a negras. Estas fuentes líquidas suponen una oportunidad clara para la recuperación del DHFG ya que éste se degrada fácilmente con los tratamientos de cocido o NaOH. Los estudios que se han llevado a cabo en el presente trabajo de tesis han mostrado la evolución del contenido de DHFG, de HT y de TY en estas aguas durante más de 12 meses para una amplia gama de variedades de aceitunas en dos estados de maduración, verde y maduro. El



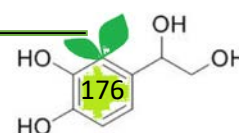
almacenamiento conlleva a un aumento progresivo de la concentración de los fenoles, alcanzando valores elevados sobre el quinto mes, que se mantienen en la mayoría de los casos hasta los doce meses. Los valores máximos de DHFG fueron sobre 140 mg/g de aceituna fresca, y en el caso de HT de 400 mg/g, lo cual presenta valores muy elevados de DHFG. Los valores obtenidos de HT son inferiores a los que se pueden llegar a obtener a partir de aceitunas tratadas con NaOH, ya que se favorece la solubilización e hidrólisis de los derivados secoiridoides como la oleuropeína. El uso de ácido mejora la extracción de fenoles, pero no de forma sustancial, por lo que las tres aguas representan una muy buena fuente de DHFG y de HT entre los 5 y los 12 meses, que es el intervalo en el que las aceitunas almacenadas son finalmente procesadas, y por tanto, es el periodo en el que estos efluentes están disponibles. Una de las ventajas que ofrece estos efluentes es que portan menos contenido en grasa o de sólidos en suspensión que una salmuera de fermentación de una aceituna que haya sido aderezada o tratada previamente con NaOH, lo cual facilita el proceso de extracción y purificación de los fenoles. Por otra parte, también es importante reseñar el hecho de que cada vez se usa un contenido menor de sal en este tipo de aguas de conservación gracias al uso del ácido, incluso se tiende a no usar sal, con lo que la depuración de estos efluentes tras la extracción de los fenoles se simplificaría muy drásticamente.

### 1.3. Subproducto común en la industria del aceite de oliva y la aceituna de mesa.

Los restos de hojas de olivo junto con ramones son retirados en el procesado de la aceituna para ambas industrias. Estas hojas suponen una importante fuente de componentes bioactivos en donde, a parte de los componentes fenólicos, encontramos los azúcares derivados del material de pared y una elevada concentración de triterpenos, entre otros.



En el caso de los fenoles se han identificado los secoiridoides como los mayoritarios, siendo éstos la oleuropeína y sus derivados. En el presente trabajo, el estudio de la hoja como fuente de DHFG se fundamentó en la búsqueda de un nuevo sistema de extracción y purificación que permitiera la obtención de un extracto rico en DHFG con baja concentración de HT. Si bien, tanto en la actividad antioxidante como en la antiinflamatoria se ha demostrado el sinergismo entre ambos fenoles, en el caso de la actividad fitorreguladora el resultado ha sido el contrario, es decir la presencia de HT en extractos de DHFG inhiben esta actividad. Es por ello por lo que, a diferencia de las fuentes encontradas tanto en almazara como en la industria de la aceituna de mesa en donde los dos fenoles se encuentran libres, la hoja supone una fuente en la que el DHFG se encuentra en forma libre o es más fácilmente extraíble en su forma libre; mientras que el HT se encuentra formando conjugados, fundamentalmente oleuropeína, cuya estructura química se diferencia más del DHFG y por tanto es más fácil su separación. En base a ello se estudiaron distintos procedimientos para su extracción, consiguiendo a través de un sencillo tratamiento térmico en condiciones muy determinadas extraer al DHFG y a la oleuropeína evitando la formación de HT. Tras la extracción y a través de un sistema cromatográfico específico y simple se conseguía la separación del DHFG de la oleuropeína. Este nuevo sistema ha sido objeto de protección intelectual y está siendo transferido a la industria para poder producir un extracto que pueda ser utilizado tanto en agricultura (ecológica, convencional y mixta) como en alimentación y en farmacia. El desarrollo de este sistema permitirá implementar su uso como fitorregulador, así como poder avanzar en la determinación del potencial biológico de esta molécula que además permitirá mejorar las propiedades sobre la salud en donde su uso potencia la actividad del HT. También permitirá la obtención de otros extractos de gran actividad biológica ricos

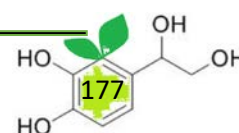


en oleuropeína y sus derivados, fundamentalmente los derivados del ácido elenólico con demostradas actividades antimicrobianas.

## **2. Medida de actividades biológicas.**

### **2.1. Actividad antioxidante.**

Los extractos obtenidos a partir del agua de alperujo contenían tanto al DHFG como al HT. Se obtuvieron extractos mediante una extracción con disolvente orgánico y mediante cromatografía iónica, ambos sistemas usados industrialmente. En ambos extractos el HT fue el fenol mayoritario, en el caso del extracto obtenido con disolvente orgánico la relación HT: DHFG fue de 26:1 mientras que en el obtenido cromatográficamente fue de 96:1. Es decir el DHFG estuvo más presente en el extracto orgánico. Es por ello por lo que este extracto mostró una mayor actividad secuestrante de radicales libres (DPPH), mientras que mostró menor poder reductor, aunque los valores en ambos casos fueron muy elevados. En el caso de la protección a la oxidación lipídica mediante el test de Rancimat en aceite de girasol, el extracto cromatográfico mostró un mayor grado de protección, alargando el periodo de inducción a la oxidación en 34.9 %, mientras que el extracto orgánico lo hizo en un 23.4 %. Teniendo en cuenta que la protección de los antioxidantes sintéticos está entre el 10 y el 15 %, los valores encontrados en el presente trabajo son bastante elevados e indicativos de la actividad antioxidante de estos fenoles. La diferencia entre ambos extractos no sólo radica en la proporción entre ambos fenoles sino en el hecho de que la extracción cromatográfica es más selectiva mientras que la orgánica llega a extraer fenoles con distinta polaridad.

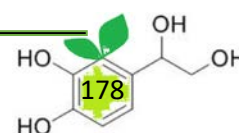


A partir de las aguas de conservación de las aceitunas naturales se llegó a purificar hasta un alto grado de pureza tanto al DHFG como al HT para la realización de un estudio de actividad antioxidante y antiinflamatoria. Respecto a la actividad antioxidante determinada por el método ORAC, al igual que se observó anteriormente con los ensayos también basados en la actividad secuestrante de radicales libres como era el caso del DPPH, se observó que el compuesto más activo es el DHFG, y que la mezcla de DHFG con HT conlleva a una mejora de la actividad del HT por un posible efecto sinérgico, como ya ha sido demostrado para otras actividades biológicas. Este hecho demuestra el potencial del fenol DHFG, así como de la fuente de la que ha sido obtenida.

## 2.2. Actividad antiinflamatoria.

A partir de los fenoles DHFG y HT purificados de las aguas de conservación de las aceitunas naturales se realizaron los ensayos en cultivos celulares de actividad antiinflamatoria. Para ello se usó una línea celular inmortal procedente de un paciente con leucemia monocítica aguda denominada THP-1. Estas células expresan marcadores específicos de los monocitos. Al ser tratadas con acetato de forbol (PMA) exhiben comportamiento macrofágico. Previamente se realizó un estudio de viabilidad celular (MTT) en macrófagos derivados de la línea celular THP-1 obteniendo una viabilidad del 100 % para los compuestos fenólicos y sus mezclas, verificando así la no toxicidad de estas moléculas.

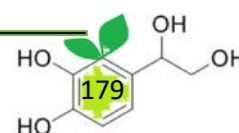
Para analizar la capacidad antiinflamatoria in vitro, los macrófagos fueron estimulados con LPS, que es un lipopolisacárido bacteriano que induce la inflamación en las células fagocíticas que secretan citoquinas proinflamatorias. La liberación de estas citoquinas por parte de las células es el principal indicador del estado inflamatorio, considerando que, si



el extracto inhibe la expresión génica de alguna citoquina proinflamatoria, podría utilizarse como un posible fármaco reparador para combatir la inflamación. Una vez producido el daño celular, se separan las células adheridas a la placa de cultivo de los sobrenadantes, y se realiza el estudio de expresión génica mediante técnicas de PCR cuantitativa para las tres citoquinas proinflamatorias. Los resultados obtenidos indican que los dos fenoles y su mezcla redujeron la expresión génica de las citocinas frente al control de LPS, y que la mezcla de los dos fenoles presentó un efecto sinérgico. El efecto antiinflamatorio del HT ha sido ampliamente descrito, sin embargo, no hay estudios sobre la evaluación de citoquinas proinflamatorias que demuestren la capacidad antiinflamatoria como en el caso de la DHPG y la mezcla HT-DHPG, y los ensayos presentados en este trabajo demuestran por primera vez que estas moléculas podrían ser utilizadas como posibles inhibidores de procesos inflamatorios. Por otro lado, se han cuantificado los niveles de citoquinas en los sobrenadantes de las células mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) para cada citoquina, y se ha demostrado que las células tratadas con DHPG secretan una menor cantidad de citoquinas al medio que el control con el inductor de la inflamación, lo que coincide con los resultados obtenidos de la expresión génica. El poder sinérgico de la mezcla de DHPG y HT en la secreción de citoquinas es significativo, y muestra, una vez más el carácter sinérgico de ambos fenoles.

### 2.3. Actividad fitorreguladora.

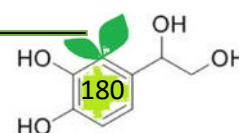
Desde un punto de vista agronómico existe una gran duda sobre la justificación del uso tradicional de pesticidas y su relación no sólo con la producción agronómica, sino también con importantes problemas sobre la salud humana y el cambio climático. De todos los pesticidas autorizados actualmente en el mercado, los herbicidas son los que han



adquirido peor fama en cuanto a su toxicidad y capacidad de contaminación. En este sentido, se ha registrado un enorme interés en el uso agronómico de sustancias capaces de actuar como reguladores del crecimiento de plantas de cultivo y que, al mismo tiempo eliminen o controlen a especies invasoras o malas hierbas.

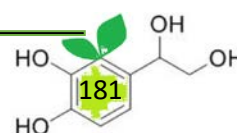
Para el estudio de esta actividad se partió de productos purificados de DHFG con presencia o no de HT. Se determinó la importancia de los extractos estudiados ricos en DHFG y con baja concentración de HT en formulaciones activas para su uso como fitorregulador tanto en ensayos de pre-emergencia como en ensayos de post-emergencia temprana y tardía. Este compuesto presenta ventajas a dosis bajas (40 ppm) ya que actúa como activador de la germinación en las semillas de cultivos y una actividad potenciadora del crecimiento en plantas a nivel de post-emergencia a dosis más elevadas (400 ppm). También se concluyó que, a diferencia del resto de propiedades biológicas estudiadas en el presente trabajo de tesis, la presencia de HT inhibe la actividad fitorreguladora del DHFG, mostrando para dicha actividad un efecto antagónico. Por lo tanto, se ha demostrado que el DHFG es un compuesto denominado aleloquímico dado que proporciona beneficios, sobre todo competitivos, en plantas principalmente dirigidos a un incremento sobre la germinación, crecimiento o desarrollo, y, por otro lado, también es capaz de inducir efectos negativos sobre otras plantas, preferentemente malas hierbas, inhibiendo su germinación e impidiendo el crecimiento de las mismas. Esta definición abarca tanto los efectos perjudiciales como los beneficiosos.

Para aumentar su eficacia se estudió la necesidad de la adición de ciertos aditivos que mejoran la estabilidad y su poder penetrante. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los diferentes ensayos (preemergencia, post emergencia temprana y tardía con estrés) se llega a la conclusión que la molécula/extracto DHFG es el idóneo para ser utilizado como fitorregulador para el control de malas hierbas, tanto mono como dicotiledoneas.





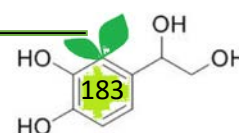
Debido a la alta toxicidad en malas hierbas frente a la nula para cultivos que presenta el DHFG, además del efecto activador en estos últimos a dosis bajas, debe ser considerado como un compuesto obtenido de forma natural para su uso tanto en agricultura convencional como ecológica, para cultivos hortícolas, cereales y leñosos, permitiendo su uso en diferentes estadios de malas hierbas y el uso de sucesivas aplicaciones, sin que ello suponga un riesgo para el cultivo, medio ambiente o salud humana.



# Conclusiones generales

## Conclusiones generales

1. El estudio del nuevo efluente generado en la industria del aceite de oliva, la denominada agua de alperujo, abre la posibilidad real de obtener de forma sencilla y económica extractos fenólicos ricos en DHFG y HT con elevada actividad biológica. Se ha comprobado su capacidad secuestrante de radicales libres, su poder reductor y su capacidad para inhibir la oxidación lipídica. La obtención de los extractos fenólicos mejora y facilita la gestión de este efluente.
2. El uso de disolventes verdes, como son los disolventes eutécticos profundos (DES), es una alternativa a tener en cuenta para la extracción de componentes bioactivos a partir del alperujo en conjunción con los recientes tratamientos térmicos. Los DES aumentan la solubilización de fenoles y azúcares, con una reducción de la temperatura de 180 °C a 120 °C. Se ha demostrado que este efecto es debido a la formación del eutéctico y no a los componentes por separado o mezclados sin formar dicho eutéctico.
3. Los efluentes generados en la conservación de la aceituna de mesa no tratadas con sosa, ya sean salmueras, salmueras acidificadas con ácido acético o agua acidificada también con ácido acético, representan una importante fuente de DHFG y de HT durante los 12 primeros meses de conservación. Por lo tanto, se dispone de fuentes durante todo el año cuya extracción fenólica mejoraría su posterior depuración y gestión.
4. Los extractos de DHFG y HT obtenidos a partir de las fuentes de la industria de aderezo presentan una importante actividad antiinflamatoria medida a través de la expresión de las citocinas por qPCR y los niveles de estas proteínas mediante ensayos ELISA.

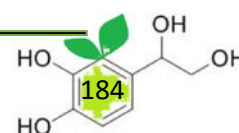


5. Se ha descubierto el carácter fitoregulator de la molécula natural de DHFG. Este fenol, en ausencia o baja presencia de HT, es capaz de activar la germinación de semillas agrícolas y de inhibir el de malas hierbas a 40 ppm, mientras que también activa el crecimiento de las plantas del cultivo agrícola y elimina las malas hierbas a dosis de 400 ppm. Para su uso en campo se ha comprobado la necesidad del uso de adyuvantes tecnológicos que mejoren su penetrabilidad a través de las hojas y las raíces, y su estabilidad frente a los factores externos. Por tanto, se ha encontrado un compuesto natural que puede sustituir o disminuir el uso de herbicida químicos pudiendo ser usado en ecológico, convencional y mixto.

6. Se ha conseguido diseñar un sistema novedoso para la obtención de un extracto rico en DHFG y con una concentración de HT por debajo del 10 % con respecto a la concentración de DHFG. Al mismo tiempo también permite la obtención de un extracto rico en oleuropeína y de sus derivados. Este sistema está bajo patente y en extensión internacional, y se basa en métodos físicos y lo suficientemente económico para posibilitar el uso del DHFG en agricultura como fitoregulator.

7. Se han identificado como materias primas para la producción de DHFG tanto a subproductos líquidos y sólidos de la industria de aderezo, como las aguas de conservación, ya sean en salmuera con o sin ácido o sólo agua con ácido, y en la industria del aceite de oliva a las aguas de alperujo y al alperujo tratado a más baja temperatura con la ayuda de los disolventes DES, así como las hojas tratadas en condiciones especiales de ambas industrias.

8. El DHFG extraído de estas fuentes con el sistema ya existente y con el desarrollado en el presente trabajo de tesis, presenta una importante actividad antioxidante, antiinflamatoria y fitoregulatora y hace posible su uso en alimentación, farmacología y en agricultura tanto ecológica como convencional.



# Otras aportaciones directamente relacionadas con la tesis

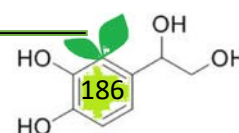
## **CONTRATOS LABORALES**

### **Doctorado Industrial: Contrato como licenciada en Química en Tecnofood I+D**

**Soluciones S.L.** Contrato cofinanciado por el Ministerio de Economía y Competitividad para la formación de “Doctores Industriales”. 2016-2019.

## **APORTACIONES A CONGRESOS**

- Denominación del evento: XVIII Simposio Científico-Técnico de EXPOLIVA 2017: “Development of natural Phyto regulator 3,4-Dihydroxyphenylglycol from olive oil by-products”. Tipo de participación: Póster. Jaén, España, 2017.  
Entidad/grupo organizador: Fundación para la Promoción y el Desarrollo del Olivar y del aceite de Oliva.
- Denominación del evento: 9th International Conference on Environmental Engineering and Management -ICEEM09: “Synergistic effects of the major simple phenols recovery from olive oil wastes as an antioxidants and new phyto-regulation approach” and “Revalorization of olive oil wastes by the extraction of bioactive compounds”. Bolonia, 6-8 Septiembre 2017. Entidad/grupo organizador: Tecnical University of Lasi, Rumanía, University of Bologna, Italia y European Federation of Biotechnology
- Denominación del evento: Workshop of The International Association of Mediterranean Agro-industrial Wastes (IAMAW): “New phyto-regulator for organic and conventional crops obtained from olive oil wastes» and “Whole utilization of agro-industrial lignocellulosic wastes for bioactive compounds”. Bolonia, 9 Septiembre 2017. Entidad/grupo organizador: International Association of Mediterranean Agro-industrial Wastes (IAMAW).

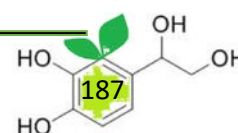


- Denominación del evento: II Jornadas Doctorales del Programa de Doctorado de Biotecnología, Ingeniería y Tecnología Química de la Universidad Pablo de Olavide desarrolladas en Carmona (Sevilla) durante los días 20 y 21 de octubre de 2017, participé activamente con la presentación de un poster y una exposición oral: “Estudio para la obtención de un herbicida natural a partir de los subproductos de la aceituna, el 3,4- Dihidroxifenilglicol”.
- Denominación del evento: 6 th International Conference on Olive and Olive Products. Olivebioteq. 15-19 Octubre 2018. Poster: “Natural bioherbicide, 3-4 dihidroxyphenylglycol from olive oil by-products”. Fernández-Prior, África., Rodríguez-Gutiérrez, Guillermo., Fernández-Bolaños, Juan., Bermúdez- Oria, Alejandra., Espejo-Calvo, Juan Antonio.

## **DOCENCIA**

Participación como ponente en el curso de Maestría en cultivo e industria del olivo. Especialización en olivicultura. Departamento de Agronomía de la Facultad de Ingeniería de San Juan (Argentina). Unidad Integrada INTA-UNSJ (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria).Lugar de celebración: San Juan (Argentina). Fecha: 6-8/06/2019. Títulos de las dos charlas de 2 h cada una:

- Disminución del impacto ambiental a través de uso de nuevos disolventes “verdes” para la extracción de fenoles del alperujo y el uso de éstos como fitorreguladores naturales en agricultura ecológica o para disminuir el uso de herbicidas químicos.
- Implicación en la salud de los principales componentes bioactivos obtenidos a partir del alperujo: ensayos para la determinación de actividad antioxidante y antiinflamatoria.





## ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

- María África Fernandez-Prior, Ángeles Trujillo, Antonio Serrano, Guillermo Rodríguez-Gutiérrez, Claudio Reinhard, Fernango G Feroso. **Biogas potential of the side streams obtained in a novel phenolic extraction system from olive mill solid waste.** *Molecules* **2020**, 25(22), 5438; <https://doi.org/10.3390/molecules25225438>



molecules



Article

### Biogas Potential of the Side Streams Obtained in a Novel Phenolic Extraction System from Olive Mill Solid Waste

África Fernández-Prior <sup>1</sup>, Ángeles Trujillo-Reyes <sup>1</sup> , Antonio Serrano <sup>1,2</sup>, Guillermo Rodríguez-Gutiérrez <sup>1</sup>, Claudio Reinhard <sup>3</sup> and Fernando G. Feroso <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Grasa, Spanish National Research Council (CSIC), Ctra. de Utrera, km. 1, 41013 Seville, Spain; mafprior@ig.csic.es (Á.F.-P.); atrujillo@ig.csic.es (Á.T.-R.); antonio.serrano@ig.csic.es (A.S.); guirogu@ig.csic.es (G.R.-G.)

<sup>2</sup> School of Civil Engineering, The University of Queensland, Campus St. Lucia—AEB Ed 49, St. Lucia, QLD 4067, Australia

<sup>3</sup> Laboratory of Food Biochemistry, ETH Zurich, Schmelzbergstrasse 9, 8092 Zurich, Switzerland; claudio.reinhard@hest.ethz.ch

\* Correspondence: fgferoso@ig.csic.es; Tel.: +34-954-611-550

Academic Editor: Prokopios Magiatis

Received: 4 November 2020; Accepted: 17 November 2020; Published: 20 November 2020

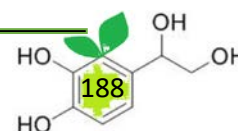


**Abstract:** The olive oil production is an important industrial sector in many Mediterranean areas, but it is currently struggled by the necessity of a proper valorisation of the olive mill solid waste or alperujo. The alperujo is the main by-product generated during the two-phase olive oil extraction, accounting for up to 80% of the initial olive mass. The alperujo is a source of valuable compounds, such as the pomace olive oil or highly interesting phenolic compounds. In the present research, a novel biorefinery approach has been used for phenolic compounds recovery. However, the extraction of these valuables compounds generates different exhausted phases with high organic matter content that are required to be managed. This study consists of the evaluation of the anaerobic biodegradability of the different fractions obtained in a novel biorefinery approach for the integral valorisation of alperujo. The results show that the different phases obtained during the biorefinery of the alperujo can be effectively subjected to anaerobic digestion and no inhibition processes were detected. The highest methane yield coefficients were obtained for the phases obtained after a two-months storages, i.e., suspended solids and liquid phase free of suspended solids, which generated  $366 \pm 7$  mL CH<sub>4</sub>/g VS and  $358 \pm 6$  mL CH<sub>4</sub>/g VS, respectively. The phenol extraction process reduced the methane yield coefficient around 25% due to the retention of biodegradable compounds during the extraction process. Regardless of this drop, the anaerobic digestion is a suitable technology for the stabilization of the different generated residual phases, whereas the high market price of the extracted phenols can largely compensate the slight decrease in the methane generation.

**Keywords:** mesophilic anaerobic digestion; valorisation; phenols; olive mill solid waste

#### 1. Introduction

Olive oil production is responsible for large amounts of agricultural by-products generally considered as waste to be disposed of. Only 20% of the olive fruit result in Extra-Virgin Oil [1]. Most Mediterranean countries face serious environmental and economic problems handling the waste produced in olive mills as its chemical composition creates challenges for stability, recycling and further processing. However, olive mill solid waste has some unique properties, most of all its high content in olive antioxidants, which makes this agricultural by-product a very interesting, abundant and low-cost resource for a wide range of value-added products [2].



# *Curriculum vitae*

## DATOS PERSONALES

---

Nombre y Apellidos: **M<sup>a</sup> África Fernández Prior**

N.I.F: 77.540.081-C

Fecha de nacimiento: 22 de febrero de 1976.

Domicilio: C/San Isidro Labrador nº 6.

San José de la Rinconada. 41300. Sevilla.

Teléfonos: **652 102 949, 954 79 19 24**

## FORMACIÓN ACADÉMICA

---

- **Licenciatura en Ciencias Químicas** por la Universidad de Sevilla.
- **Título de Bachillerato Unificado Polivalente.** Instituto de Enseñanza Secundaria Obligatoria “Miguel de Mañara”. San José de La Rinconada. Sevilla.

## FORMACIÓN COMPLEMENTARIA

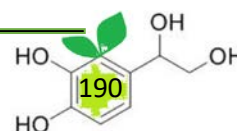
---

- **Curso Seguridad y Salud en el Laboratorio Químico.** Impartido por la Fundación Cámara de la Universidad de Sevilla. Año 1999. Duración 12 horas.
- **Curso Estudios de Biomoléculas y Obtención de Imágenes por Resonancia Magnética Nuclear.** Impartido por la Fundación Cámara de la Universidad de Sevilla. Año 2000. Duración 11 horas.
- **Curso Prevención de Riesgos Laborales en las Sociedades Cooperativas Andaluzas.** Impartido por Emcofeantran en colaboración con la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía. Año 2007. (5 horas).
- **Curso de Informática para usuarios** impartido por Emcofeantran en colaboración con la consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la junta de Andalucía través de la Dirección general de Economía Social y Emprendedores y el Fondo Social Europeo. Inicio 6/11/2006. Fin: 30/01/2007. Duración de 200 h.
- **Curso Gestión Integral del agua.** Impartido por la Confederación de Empresarios Andaluces. Año 2012. (70 h).
- **Curso de Tratamiento de datos estadísticos R: estadística básica y representaciones gráficas,** impartido en la Universidad Pablo de Olavide de 10 h de duración. Año 2018.
- **Curso sobre elaboración de presentaciones orales efectivas.** Impartido por la Universidad Pablo de Olavide de 20 h de duración. Año 2018
- **Curso de Delegado de Protección de Datos.** Impartido por la plataforma Prepara tu Futuro Online, de 60 h de duración repartida en dos módulos de 30 h cada uno. Año 2018
- **Curso de Inglés B2** impartido en el Servicio de Idiomas de la Universidad Pablo de Olavide de 90 h de duración. Año 2018.
- **Curso de Competencias en tecnologías de la Información y Comunicación,** impartido por los servicios de la Biblioteca de la Universidad Pablo de Olavide de 12 h de duración. Año 2019.

## EXPERIENCIA PROFESIONAL y CIENTÍFICA

---

- **Contrato en prácticas en Laboratorios BIO-DIS ESPAÑA, S.L (Nutrición, dietética y suplementos).** Dentro del programa EQUAL “MARE” financiada con



fondos FEDER y en colaboración con la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía con una duración de nueve meses desde marzo a noviembre de 2007

- **Contrato como Asistente de Investigación en Provexis Natural Products Limited LPC (Spin off con sede en Rowett Research Institute of Nutrition and Health perteneciente a la Universidad de Aberdeen, Escocia, Reino Unido)** con una duración de dieciocho meses desde mayo de 2008 a noviembre de 2009.
- **Prácticas en el Instituto de la Grasa (CSIC)** con una duración de tres meses desde julio a septiembre de 2012.
- **Contrato como Técnico de laboratorio en Subproductos Vegetales de Mediterráneo S.L (EBT, empresa de base tecnológica del Instituto de la Grasa-CSIC)** de duración entre marzo y julio de 2013.
- **Contrato como licenciada en Química en Tecnofood I+D Soluciones S.L** de siete meses de duración entre abril y noviembre de 2015 asociado al programa de proyectos Recupera 2020 cofinanciado con fondos FEDER.
- **Doctorado Industrial: Contrato como licenciada en Química en Tecnofood I+D Soluciones S.L.** Contrato cofinanciado por el Ministerio de Economía y Competitividad para la formación de “Doctores Industriales”. Duración de tres años desde octubre de 2016 hasta octubre de 2019.
- **Contrato como titulada superior en el Instituto de la Grasa-CSIC.** Contrato comprendido entre noviembre- diciembre de 2019 asociado al Proyecto PHENOLIVA: Treatment and valorisation of olive mill wastes. Application of olive polyphenols to food,
- **Contrato como titulada superior en el Instituto de la Grasa-CSIC.** Período de contrato 1 mayo al 31 de diciembre 2020, asociado al Proyecto PHENOLIVA: Treatment and valorisation of olive mill wastes. Application of olive polyphenols to food
- **Contrato como titulada superior en el Instituto de la Grasa-CSIC.** Período de contrato 26 de enero al 26 de julio 2021, asociado al Proyecto: Aplicación de un proceso de presión en frío para mejorar tanto la calidad y rendimiento del aceite como la gestión de sus productos. Entidad financiadora: Junta de Andalucía.

## **PROYECTOS CIENTÍFICOS**

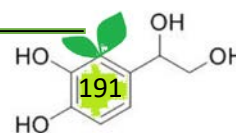
---

-Título del proyecto: **Servicio I+D+i para el desarrollo de biofungicidas naturales a partir de los subproductos del aceite de oliva.** Entidad financiadora: Proyecto Recupera 2020 cofinanciado con Fondos FEDER (POFT). Año 2015

-Título del proyecto: **Caracterización de las fracciones funcionales de la aceituna de oliva, formulación de nuevos productos y análisis de sus efectos (NUTRADAF).** Entidad financiadora: Programa FEDER-INNTERCONECTA. Año 2018.

-Título del proyecto: **PHENOLIVA: Treatment and valorisation of olive mill wastes. Application of olive polyphenols to food.** Entidad financiadora: EIT FOOD CALL TEMPLATE 2020. Año 2019/2020

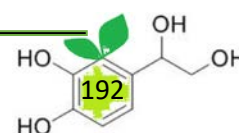
-Título del proyecto: **Aplicación de un proceso de presión en frío para mejorar tanto la calidad y rendimiento del aceite como la gestión de sus productos.** Entidad



financiadora: Junta de Andalucía. Plan andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación (PAIDI 2020). Convocatoria 2018.

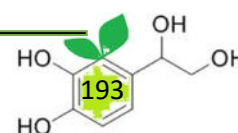
## PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

1. Antonio Lama-Muñoz, Fátima Rubio-Senent, Alejandra Bermúdez-Oria, Juan Fernández-Bolaños, África Fernández-Prior, Guillermo Rodríguez-Gutiérrez. **The use of industrial thermal techniques to improve the bioactive compounds extraction and the olive oil solid waste utilization.** *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2019. Volume 55, p.p. 11-17.  
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.05.009>
2. Antonio Lama-Muñoz, Fátima Rubio-Senent, Alejandra Bermúdez-Oria, África Fernández-Prior, Juan Fernández-Bolaños, Guillermo Rodríguez-Gutiérrez. **Synergistic effect of 3,4-dihydroxyphenylglycol with hydroxytyrosol and  $\alpha$ -tocopherol on the Rancimat oxidative stability of vegetable oils.** *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 2019. Volume 51, p.p. 100-106.  
<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.08.001>
3. Alejandra Bermúdez-Oria, Guillermo Rodríguez-Gutiérrez, Fátima Rubio-Senent, África Fernández-Prior, Juan Fernández-Bolaños. **Effect of edible pectin-fish gelatin films containing the olive antioxidants hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol on beef meat during refrigerated storage.** *Meat Science* 2019. Volume 148, p.p. 213-218 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.07.003>
4. Carolina Hernández-Hernández, Ana Morales-Sillero, África Fernández-Prior, Juan Fernández-Bolaños, María de la Paz Aguilera-Herrera and Guillermo Rodríguez-Gutiérrez. **Extra virgin olive oil jam enriched with cocoa bean husk extract rich in theobromine and phenols.** *LWT - Food Science and Technology* 2019 Volume 111, 2019, p.p. 278-283. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.027>
5. Alejandra Bermúdez-Oria, Guillermo Rodríguez-Gutiérrez, África Fernández-Prior, Blanca Vioque, Juan Fernández-Bolaños. (2019). **Strawberry dietary fibre functionalized with phenolic antioxidants from olives. Interactions between polysaccharides and phenolic compounds.** *Food Chemistry* 2019 Volume 280, 2019, p.p. 310-320. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.057>
6. Ander Arando, Juan Vicente Delgado, África Fernández-Prior, José Manuel León, Alejandra Bermúdez-Oria, Sergio Nogales, Carlos C. Pérez-Marín. **Effect of different olive oil-derived antioxidants (hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol) on the quality of frozen- thawed ram sperm.** *Cryobiology* 2019 Volume 86, p.p. 33-39.  
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.01.002>
7. Alejandra Bermúdez-Oria, Guillermo Rodríguez-Gutiérrez, África Fernández-Prior, H. Knicker and Juan Fernández-Bolaños, J. (2019). **Confirmation by solid-state NMR spectroscopy of a strong complex phenol-dietary fiber with retention of antioxidant activity in vitro.** *Food Hydrocolloids* 2020 Volume 102, 105584.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105584>
8. Ander Arando, Juan Vicente Delgado, Alejandra Bermúdez-Oria, José Manuel León, África Fernández-Prior, Sergio Nogales, Carlos C. Pérez-Marín. **Effect of olive-derived antioxidants (3,4-dihydroxyphenylethanol and 3,4 dihydroxyphenylglycol) on sperm motility and fertility in liquid ram sperm stored at 15°C or 5°C.** *Reproduction in Domestic Animals* 2020 Volume 55 (3), p.p. 325-332.  
<https://doi.org/10.1111/rda.13631>
9. María África Fernández-Prior, Akram Charfi, Alejandra Bermúdez-Oria, Elisa Rodríguez-Juan, Juan Fernández-Bolaños and Guillermo Rodríguez-Gutiérrez. **Deep**





- eutectic solvents improve the biorefinery of alperujo by extraction of bioactive molecules in combination with industrial thermal treatments.** *Food and Bioprocess Technology* 2020. Volume 121, p.p 131-147 <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.02.001>
10. Marcos Vázquez-González, África Fernández-Prior, Alejandra Bermúdez Oria, Elisa María Rodríguez-Juan, Ana G. Pérez-Rubio, Juan Fernández-Bolaños and Guillermo Rodríguez-Gutiérrez. **Utilization of strawberry and raspberry waste for the extraction of bioactive compounds by deep eutectic solvents.** *LWT - Food Science and Technology Food* 2019. Volume 130, 2020, 109645 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109645>
  11. María África Fernández-Prior, Juan Carlos Pérez Fatuarte, Alejandra Bermúdez Oria, Isabel Viera-Alcaide, Juan Fernández-Bolaños and Guillermo Rodríguez Gutiérrez. **New liquid source of antioxidant phenolic compounds in the olive oil waste ponds: alperujo water.** *Foods* 2020, 9(7),962; <http://doi:10.3390/foods9070962>
  12. María África Fernandez-Prior, Ángeles Trujillo, Antonio Serrano, Guillermo Rodríguez-Gutiérrez, Claudio Reinhard, Fernango G Feroso. **Biogas potential of the side streams obtained in a novel phenolic extraction system from olive mill solid waste.** *Molecules* 2020, 25(22), 5438; <https://doi.org/10.3390/molecules25225438>
  13. Alejandra Bermudez-Oria, Yogurthane Bouchal, África Fernández-Prior, Blanca Vioque, Juan Fernández- Bolaños. **Strawberry puree functionalized with the natural hydroxytyrosol: Effects on vitamin C and antioxidant activity.** *Molecules* 2020, 25(24), 5829; <https://doi.org/10.3390/molecules25245829>
  14. África Fernández-Prior, Alejandra Bermúdez-Oria, María del Carmen Millán-Linares, Juan Fernández-Bolaños, Juan Antonio Espejo-Calvo and Guillermo Rodríguez-Gutiérrez. **Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol and 3,4-Dihydroxyphenylglycol Purified from Table Olive Effluents.** *Foods* 2021, 10, 227. <https://doi.org/10.3390/foods10020227>.
  15. Álvaro Hernáez, Sara Jaramillo, Aránzazu García-Borrego, Juan-Antonio Espejo-Calvo, Maria-Isabel Covas, Gemma Blanchart, Rafael de laTorre, Alegría Carrasco-Pancorbo, María-Dolores Mesa, María-África Fernández-Prior, Olga Castañer, Montserrat Fitó. **From green technology to functional olive oils: assessing the best combination of olive tree-related extracts with complementary bioactivities.** *Antioxidants* 2021, 10(2), 202; <https://doi.org/10.3390/antiox10020202>
  16. Malika Tassoult, Djamel-Edine Kati, María África Fernández-Prior, Alejandra Bermúdez-Oria, Juan Fernández-Bolaños, Guillermo Rodríguez-Gutiérrez. **Antioxidant capacity, phenolic and sugar profiles of date fruits extracts from six different Algerian cultivars as influenced by ripening stages and extraction system.** *Foods* 2021, 10(3), 503; <https://doi.org/10.3390/foods10030503>
  17. Mónica Sánchez-Gutiérrez, Isabel Bascón-Villegas, Alejandro Rodríguez, FernandoPérez-Rodríguez,África Fernández-Prior,Antonio Rosal and Elena Carrasco. **Valorisation of Olea europaea L. Olive Leaves through the evaluation of their extracts: antioxidant and antimicrobial activity.** *Foods* 2021, 10, 966; <https://doi.org/10.3390/foods10050966>
  18. Fernando Ramos-Escudero, Sandra Casimiro-Gonzáles, África Fernández-Prior, Keidy Cancino-Chávez, José Gómez-Mendoza,Luciana de la Fuente-Carmelino, Ana María Muñoz. **Colour, fatty acids, bioactive compounds, and total antioxidant capacity in commercial cocoa beans (*Theobroma cacao* L.).** *LWT - Food Science and Technology*, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111629>
  19. Ander Arando, Francisco Javier Navas González, Alejandra Bermúdez-Oria, Juan Vicente Delgado, África Fer nández-Prior, Antonio González-Ariza, Juan Manuel León and Carlos Carmelo Pérez-Marín. **Bayesian analysis of the effects of olive oil-derived**



antioxi-2 dants on cryopreserved buck sperm parameters. *Animals* 2021 (En revision: segunda revisión).

20. Carolina Hernández-Hernández, Víctor M. Fernández-Cabanás, Guillermo Rodríguez-Gutiérrez, África Fernández-Prior, Ana Morales-Sillero. **Rapid screening of unground cocoa beans based on their content of bioactive compounds by NIR spectroscopy.** *Postharvest Biology and Technology* 2021 (En revision: segunda revisión).

---

## PATENTES CIENTÍFICAS

---

- **Patente 1:** Rodríguez-Gutiérrez, G., Fernández-Bolaños, J., García-Borrego, A., Espejo-Calvo, J.A., Rojano-Delgado, A.M. y Fernández-Prior, M.A. “**Uso del 3,4-dihidroxifenilglicol (DHFG) como fitorregulador**”. Número de solicitud nacional P201631404 (España 3/11/2016). Iniciados los trámites de licencia para la explotación industrial por parte de la Empresa ECONATUR S.L. Extendida internacionalmente WO 2018/08361A1.
- **Patente 2:** Fernández-Prior, M.A. Espejo-Calvo, J.A., Rodríguez-Gutiérrez, G., Fernández-Bolaños, J., Bermúdez-Oria, A. “**Procedimiento para la obtención de extractos ricos en 3,4-dihidroxifenilglicol**”. Número de solicitud nacional: P202030495 (España 28/05/2020)

---

## ESTANCIAS INTERNACIONALES

---

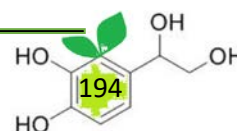
- **Universidad de Aberdeen, Escocia, Reino Unido:** Asistente de Investigación en Provexis Natural Products Limited LPC (Spin off con sede en Rowett Research Institute of Nutrition and Health perteneciente a la) con una duración de dieciocho meses desde mayo de 2008 a noviembre de 2009.

---

## ASISTENCIA A CONGRESOS

---

1. Denominación del evento: XVIII Simposio Científico-Técnico de EXPOLIVA 2017: “Development of natural Phyto-regulator 3,4-Dihydroxyphenylglycol from olive oil by-products”. Tipo de participación: Póster. Jaén, España, 2017. Entidad/grupo organizador: Fundación para la Promoción y el Desarrollo del Olivar y del aceite de Oliva.
2. Denominación del evento: 9th International Conference on Environmental Engineering and Management -ICEEM09: “Synergistic effects of the major simple phenols recovery from olive oil wastes as an antioxidants and new phyto-regulation approach” and “Revalorization of olive oil wastes by the extraction of bioactive compounds”. Bolonia, 6-8 Septiembre 2017. Entidad/grupo organizador: Tecnical University of Lasi, Rumanía, University of Bologna, Italia y European Federation of Biotechnology.
3. Denominación del evento: Workshop of The International Association of Mediterranean Agro-industrial Wastes (IAMAW): “New phyto-regulator for organic and conventional crops obtained from olive oil wastes» and “Whole utilization of agro-industrial lignocellulosic wastes for bioactive compounds”. Bolonia, 9 Septiembre 2017. Entidad/grupo organizador: International Association of Mediterranean Agro-industrial Wastes (IAMAW).





4. Denominación del evento: 1st International Congress on METals in anarobic Biotechnologies (IMAB17): “Thermal treatment for olive oil wastes utilization: bioactives compounds and substrate for soil contaminated remediation”. Sevilla, 4-6 Octubre 2017. Entidad/grupo organizador: Instituto de la Grasa (CSIC)- Universidad Pablo de Olavide- Universidad de Sevilla.
5. Denominación del evento: II Jornadas Doctorales del Programa de Doctorado de Biotecnología, Ingeniería y Tecnología Química de la Universidad Pablo de Olavide desarrolladas en Carmona (Sevilla) durante los días 20 y 21 de octubre de 2017, participé activamente con la presentación de un poster y una exposición oral: “Estudio para la obtención de un herbicida natural a partir de los subproductos de la aceituna, el 3,4- dihidroxifenilglicol”.
6. Denominación del evento: I Simposio de Residuos Agropecuarios y Agroindustriales del Noa y Cuyo: “Obtención y usos de compuestos bioactivos y de alto interés a partir de subproductos agroindustriales”. Lugar de celebración y año: San Juan Argentina 3-5/10/2018. Entidad/grupo organizador: Instituto Nacional de Tecnologías Agropecuarias (INTA), Argentina. Tipo de participación: Comunicación escrita.
7. Denominación del evento: 4th Iberoamerican Congress on Biorefinery (4-CIAB): “Thermal pre-treatment in combination of anaerobic bioprocess for agro-industrial wastes”. Lugar de celebración y año: Sevilla, 24-26 octubre 2018. Entidad/grupo organizador: Universidad de Jaén. Tipo de participación: Comunicación póster.
8. 6 th International Conference on Olive and Olive Products. Olivebioteq. 15-19 Octubre 2018. Poster: Natural bioherbicide, 3-4 dihidroxifenilglicol from olive oil byproducts. Fernández-Prior, África, Rodríguez-Gutiérrez, Guillermo, Fernández-Bolaños, Juan., Bermúdez- Oria, Alejandra., Espejo-Calvo, Juan Antonio.
9. Denominación del evento: XX Simposio Científico-Técnico de EXPOLIVA 2021: “Evaluación de la mejor combinación de extractos de olivo con bioactividades. Tipo de participación: contribución escrita en el IV foro de la alimentación, la salud y el aceite de oliva Jaén, España, 2021. Entidad/grupo organizador: Fundación para la Promoción y el Desarrollo del Olivar y del aceite de Oliva

## DOCENCIA

---

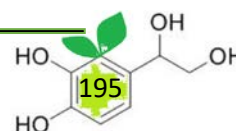
Participación como ponente en el curso de Maestría en cultivo e industria del olivo. Especialización en olivicultura. Departamento de Agronomía de la Facultad de Ingeniería de San Juan (Argentina). Unidad Integrada INTA-UNSJ (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). Lugar de celebración: San Juan (Argentina). Fecha: 6-8/06/2019. Títulos de las dos charlas de 2 h cada una:

- Disminución del impacto ambiental a través de uso de nuevos disolventes “verdes” para la extracción de fenoles del alperujo y el uso de éstos como fitoreguladores naturales en agricultura ecológica o para disminuir el uso de herbicidas químicos.
- Implicación en la salud de los principales componentes bioactivos obtenidos a partir del alperujo: ensayos para la determinación de actividad antioxidante y antiinflamatoria.

## CONOCIMIENTOS DE INFORMÁTICA E IDIOMAS

---

- **Informática nivel usuario.** Conocimientos de procesadores de texto, hojas de cálculo, bases de datos, presentaciones gráficas e Internet.



- **Inglés:** nivel alto en lectura, habla y redacción (título B2 certificado por CertAcles según el Marco Común Europeo de Referencia para las lenguas).
- **Carné de conducir B1.**